

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

08 January 2001 (08.01.01)

International application No.

PCT/EP00/05127

Applicant's or agent's file reference

43 222-22

International filing date (day/month/year)

05 June 2000 (05.06.00)

Priority date (day/month/year)

04 June 1999 (04.06.99)

Applicant

BALJER, Georg et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 November 2000 (21.11.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Nestor Santesso

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

by fax and post

An:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Hamburg

12. APR. 2001

SCHRIFTLICHER BESCHEID
(Regel 66 PCT)

FAX: 040 36 40 39

Absenddatum
(Tag/Monat/Jahr)

18.04.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43 222-22

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von 2 Monat(en)
an obigem Absenddatum

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP00/05127

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

04/06/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK

C12N15/62

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al

1. Dieser Bescheid ist der erste schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde

2. Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheides
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

3. Der Anmelder wird aufgefordert, zu diesem Bescheid Stellung zu nehmen

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.3 und 66.3.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4. Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis. Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.5.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

4. Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 04/10/2001.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde:

Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 eomud
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

SCHEFFZYK, I

Formalsachbearbeiter (einschl. Postverlängerung)

Emsländer, S

Tel. +49 89 2399 3713



I. Grundlage des Bescheids

1. Hinsichtlich der Bestandteile der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht"*):

Beschreibung, Seiten:

1-17 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-31 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der Sprache: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgenau in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ansprüche	1-31
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	1-31
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche	

- 2. Unterlagen und Erklärungen:**
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

SEKTION V-----

Der Gegenstand vorliegender Ansprüche 1-31 wird durch die Lehre der Entgegenhaltung WO 98/11229 (1) neuheitsschädlich vorweggenommen. Darüberhinaus ist das Dokument WO 96/30043 (2) für Ansprüche 1-27 neuheitsschädlich.

Ferner werden in den Dokumenten FR-A-2 766 193 (3), *Infection and Immunity*, Jan. 1995, p- 301-308 Acheson D.W.K. et al (4), *Veterinary Microbiology* 43 (1995) 41-52, Franke S. et al (5) und *Deutsche Tierärztliche Wochenzeitschrift*, Bd. 102, Januar 1995, Seiten 40-43 (6) Stx2e Fusionsproteine gemäß Ansprüchen 1-3 beschrieben.

Demnach erfüllen vorliegende Ansprüche nicht das Erfordernis des Art. 33(2) PCT.

Darüberhinaus kann auch das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit nicht anerkannt werden, denn das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Prinzip (Bereitstellung eines Shiga Toxin Fusionsproteins und dessen Verwendung als Impfstoff) wird bereits im Stand der Technik beschrieben (siehe oben, insbesondere (1), (2) und (6)). Daher erfüllen vorliegende Ansprüche auch nicht das Erfordernis des Art. 33(3) PCT.

SEKTION VIII-----

- 1). Der in Anspruch 6 verwendete Ausdruck "für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit der Tiere" ist vage und macht daher den Schutzzumfang dieses Anspruchs unklar.
- 2). Anspruch 13 ist unklar: Anspruch 6, zu dem Anspruch 13 einen Rückbezug enthält, ist auf eine Impfstoffzusammensetzung gerichtet, die ein Fusionsprotein gemäß Anspruch 1 enthält. Aufgrund der "und/oder" Formulierung in Anspruch 13 ist die Anwesenheit eines solchen Fusionsproteins in der Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 13 nicht unbedingt erforderlich. Dies ist jedoch nicht in Übereinstimmung mit Anspruch 6. Zudem ergibt sich dann ein

Einwand unter Regel 13.1-13.3 PCT (Nicht-Einheitlichkeit).

- 3). Anspruch 15 ist nicht im Einklang mit Anspruch 1, denn die Größe des terminalen Tags ist nicht festgelegt. Demnach ergibt sich auch hier ein Einwand unter Regel 13.1-13.3 PCT. ✓
- 4). Betreffend Anspruch 17 wird festgestellt, dass Anspruch 6 nicht auf ein Fusionsprotein gerichtet ist.
- 5). Anspruch 20 ist unvollständig, denn das in diesem Anspruch definierte Verfahren behandelt ausschliesslich die Herstellung des subgenischen Shigatoxins. Im Hinblick auf die in Anspruch 20 definierten Verfahrensschritte ist demnach die geforderte Expression und Reinigung eines Fusionsproteins nicht möglich.
- 6). Ansprüche 29-31 scheinen sich auf die Herstellung von gegen das beanspruchte Fusionsprotein gerichtete Antikörper zu beziehen. Der Rückbezug zu Anspruch 20 ist demnach fraglich.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 08 January 2001 (08.01.01)		
Applicant's or agent's file reference 43 222-22		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/EP00/05127	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	
		Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CN, PL, RU, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : BY, HU, UA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until **31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Nestor Santesso Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
IM GEBIET DES PATENTWESSENS

Absender: DIE MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

PCT

An

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

MITTEILUNG ÜBER DEN EINGANG DES
ANTRAGS BEI DER ZUSTÄNDIGEN MIT DER
INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG
BEAUFTRAGTEN BEHÖRDE

(Regeln 59.3 e) und 61.1 b) Satz 1 PCT sowie
Abschnitt 601 a) der Verwaltungsvorschriften)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

01. 12. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43 222-22

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05127

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

04/06/1999

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nachstehendes Datum als Eingangsdatum des Antrags auf internationale vorläufige Prüfung der internationalen Anmeldung betrachtet:

21/11/2000

2. Dieses Eingangsdatum entspricht:

- ☒ dem tatsächlichen Eingangsdatum des Antrags bei der Behörde (Regel 61.1 b)).
☐ dem tatsächlichen Datum, an dem der Antrag für die Behörde entgegengenommen worden ist (Regel 59.3 e)).
☐ dem Datum, an dem die Behörde auf die Aufforderung zur Behebung von Mängeln des Antrags (Formblatt PCT/IPEA/404) hin die erforderlichen Berichtigungen erhalten hat.

3. ☐ ACHTUNG: Das Eingangsdatum liegt NACH dem Ablauf von 19 Monaten ab dem Prioritätsdatum. Folglich führt die im Antrag erfolgte Auswahl von Vertragsstaaten nicht zu einer Verschiebung des Eintritts in die nationale Phase bis zu 30 (oder in manchen Ämtern mehr) Monaten ab dem Prioritätsdatum (Artikel 39 (1)). Daher müssen die für den Eintritt in die nationale Phase erforderlichen Handlungen innerhalb von 20 (oder in manchen Ämtern mehr) Monaten ab dem Prioritätsdatum (Artikel 22) vorgenommen werden. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, BAND II zu entnehmen.

☐ (falls zutreffend) Diese Mitteilung gilt als Bestätigung der am _____
per Telefon, Fax oder persönlich erteilten Auskunft.

4. Nur wenn Punkt 3 zutrifft, wurde dem Internationalen Büro ein Exemplar dieser Mitteilung übermittelt.

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen
Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

DONNELLY P P

Tel. (+49-89) 2399-2362



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 14 December 2000 (14.12.00)		S.	
Applicant's or agent's file reference 43 222-22			
International application No. PCT/EP00/05127		International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al			

IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
BY,CN,EP,HU,PL,RU,UA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 14 December 2000 (14.12.00) under No. WO 00/75345

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

IPEA/ EP

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung
die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem
Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 43 222-22
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/06/2000	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 04/06/1999

Bezeichnung der Erfindung kombinantes Fusionsprotein, dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung und Verfahren zu dessen Herstellung
--

Feld Nr. II ANMELDER	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG Heinz-Lohmann-Strasse 4, D-27472 Cuxhaven/DE	Telefonnr.: Telefaxnr.: 04721/747-0 Fernschreibnr.: 04721/747 161
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) BALJER, Georg Ludwig-Rinn-Strasse 15 D-35452 Heuchelheim/DE	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) FRANKE, Sylvia Elly-Heuss-Knapp-Weg 18 D-35396 Gießen/DE	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER: ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
 und ☒ ist vorn (von den): Anmelder(n): bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie): auch für die internationale vorläufige Prüfung.
☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

SIEMONS, Norbert

Neuer Wall 41

D-20354 Hamburg/DE

Telefonnr.:
040/36 67 55Telefaxnr.:
040/36 40 39

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
 ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
 ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei):
 ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei):
 ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei):
 berücksichtigt.
 iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
 iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
 v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen.....

(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)

Feld Nr. WIKONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Änderungen nach Artikel 34

Beschreibung	:	Blätter
Ansprüche	:	Blätter
Zeichnungen	:	Blätter

2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34

: Blätter

3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19

: Blätter

4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19

: Blätter

5. Sonstige (einzeln auführen):

: Blätter

erhalten

nicht erhalten

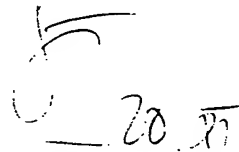
☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ unterzeichnete gesonderte Vollmacht4. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung2. ☒ Kopie der allgemeinen Vollmacht5. ☐ sonstige3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.


 SIEMONS, Norbert
 Patentanwalt

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anlage zum Antrag auf internationale vorläufige Prüfung

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05127
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 43 222-22

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung
beauftragten Behörde auszufüllen

Eingangsstempel der IPEA

Anmelder LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG
--

Berechnung der vorgeschriebenen Gebühren

1. Gebühr für die vorläufige Prüfung..... **EUR 1.533,00** **P**

*Bearbeitungsgebühr (Anmelder aus einigen Staaten
haben Anspruch auf eine Ermäßigung der
Bearbeitungsgebühr um 75%. Hat der Anmelder (oder
haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so
beträgt der in Feld B einzutragende Betrag 25 % der
Bearbeitungsgebühr.)*

EUR 147,00 **B**

3. Gesamtbetrag der vorgeschriebenen Gebühren
Addieren Sie die Beträge in den Feldern
P und B und tragen Sie die Summe in
das nebenstehende Feld ein.....

EUR 1.680,00

INSGESAMT

Zahlungsart

☒ Abbuchungsauftrag für das
laufende Konto bei der IPEA
2800 0409

☐ Barzahlung

☐ Scheck

☐ Gebührenmarken

☐ Postanweisung

☐ Kupons

☐ Bankwechsel

☐ Sonstige (einzeln angeben):

Abbuchungsauftrag (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Behörden)

Die IPEA / EP

☒ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden
Konto abzubuchen.

☐ (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften der IPEA über laufende Konten dieses Verfahren
erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags
der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.

20. November 2000

Dr.-Ing. Norbert Siemons, Patentanwalt

Kontonummer **2800 0409**

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

Formblatt PCT/IPEA/401 (Anlage) (Januar 1996)

Siehe Anmerkungen zum Blatt für die Gebührenberechnung

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

SIEMONS, Norbert Eingang Hambu g
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
GERMANY

9. OKT. 2000

ent.

not.

MITTEILUNG ÜBER DIE ERSTATTUNG
DER RECHERCHEGEBÜHR

(Regeln 16.3 und 41.1 PCT und Abschnitt 510
der Verwaltungsrichtlinien)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

06/10/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43222-22

NUR ZUR INFORMATION

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05127

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm ein Betrag von EUR 945,- (Währung/Betrag) von der für die internationale Anmeldung ordnungsgemäß entrichteten Recherchegebühr erstattet wird. Die Höhe des Betrages richtet sich danach, ob

- a) ☐ der frühere internationale Recherchenbericht,
b) ☐ der Bericht über die Recherche internationaler Art,
c) ☒ der andere Recherchenbericht,

EP99110759

auf den im Antrag Bezug genommen wird, ganz oder teilweise für die Erstellung des internationalen Recherchenberichts über die internationale Anmeldung verwertet wurde.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm der als Recherchegebühr entrichtete Betrag von _____ (Währung/Betrag) erstattet wird, da die internationale Anmeldung noch vor Beginn der internationalen Recherche zurückgenommen wurde oder als zurückgenommen angesehen wurde.

3. Der obengenannte Betrag wird im Rahmen eines gesonderten Vorgangs erstattet.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andria Overbeeke-Siepkas

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 26 July 2000 (26.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 43 222-22	International application No. PCT/EP00/05127

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG (for all designated States except US)
BALJER, Georg et al (for US)

International filing date	:	05 June 2000 (05.06.00)
Priority date(s) claimed	:	04 June 1999 (04.06.99)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	30 June 2000 (30.06.00)
List of designated Offices	:	

✓ EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, BY, CN, HU, PL, RU, UA, US

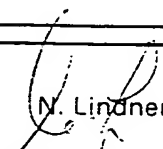
ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☐ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: <div style="text-align: center;">  N. Lindner </div> Telephone No. (41 22) 338.83.38
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

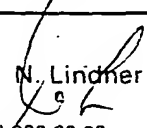
To:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 26 July 2000 (26.07.00)	
Applicant's or agent's file reference 43 222-22	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP00/05127	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 June 1999 (04.06.99)	99110759.0	EP	05 July 2000 (05.07.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  N. Lindner </div> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN**

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
GERMANY

BENACHRICHTIGUNG ÜBER DEN EINGANG DES
RECHERCHENEXEMPLARS

(Regel 25.1 PCT)

Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	13/07/2000
----------------------------------	------------

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43222-22

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05127

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Prioritätsdatum

(Tag/Monat/Jahr)

04/06/1999

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG

1. Falls die Internationale Recherchenbehörde nicht mit dem Anmeldeamt identisch ist:

Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß das Recherchenexemplar der internationalen Anmeldung an dem nachstehend angegebenen Datum bei der Internationalen Recherchenbehörde eingegangen ist.

Falls die Internationale Recherchenbehörde und das Anmeldeamt identisch sind:

Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß das Recherchenexemplar der internationalen Anmeldung an dem nachstehend angegebenen Datum eingegangen ist:

28/06/2000 (Eingangsdatum).

2. ☐ Dem Recherchenexemplar war ein Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form beigelegt.

3. Frist für die Erstellung des internationalen Recherchenberichts

Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß die Frist für die Erstellung des internationalen Recherchenberichts drei Monate ab dem obengenannten Eingangsdatum oder neun Monate ab dem Prioritätsdatum beträgt, je nachdem welche Frist später abläuft.

4. Ein Exemplar dieser Benachrichtigung ist dem Internationalen Büro und, sofern Absatz 1 erster Satz zutrifft, dem Anmeldeamt übermittelt worden.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-2015

Bevollmächtigter Bediensteter

ISA/EP

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Sender: ANMELDEAMT

PCT

Abg.
28/8

An
Siemons, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

30. JUNI 2000

berl.
not. 28/77

AUFFORDERUNG ZUR BESEITIGUNG VON MÄNGELN DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG

(Artikel 3(4)i) und 14(i) sowie Regel 26 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 43 222-22	Absenddatum (Tag; Monat; Jahr) 28. 06. 2000
Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 00/ 05127	INTERNATIONALE ANMELDUNG ANTWORT FÄLLIG innerhalb von zwei Monaten ab obigem Absenddatum
Anmelder LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG	Internationales Anmeldedatum (Tag; Monat; Jahr) 05/06/2000

- I. ☒ Der Anmelder wird aufgefordert, die Mängel in der eingereichten Fassung der internationalen Anmeldung innerhalb der oben angegebenen Frist zu beseitigen; sie sind aufgeführt im beiliegenden

☒ Anhang A

☐ Anhang B1 (Text der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung)

☐ Anhang C1 (Zeichnungen der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung)

Weitere Anmerkungen (falls erforderlich):

BERICHTIGUNG VON MÄNGELN

Berichtigungen sind auf einem Ersatzblatt, das die Berichtigung enthält, mit einem Begleitschreiben einzureichen, das auf die Unterschiede zwischen dem auszutauschenden Blatt und dem Ersatzblatt hinweist. Berichtigungen können nur dann in einem Schreiben niedergelegt werden, wenn sie so beschaffen sind, dass sie von diesem Schreiben in das Aktenexemplar übertragen werden können, ohne die Übersichtlichkeit oder Vervielfältigungsfähigkeit des Blattes zu beeinträchtigen, auf das die Berichtigung zu übertragen ist (Regel 26.4).

ACHTUNG

Werden die Mängel nicht beseitigt, so gilt die internationale Anmeldung im Anmeldeamt als zurückgenommen (weitere Einzelheiten sind Regel 26.5 zu entnehmen).

Ein Exemplar dieser Aufforderung mit etwaigen Anlagen ist übermittelt worden an das Internationale Büro

☐ und die Internationale Recherchenbehörde.

Name und Postanschrift des Anmeldeamts



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

[Signature]

G. Koestel

Das Anmeldeamt hat in der eingereichten Fassung der internationalen Anmeldung folgende Mängel festgestellt:

1. Hinsichtlich der Unterschrift * der internationalen Anmeldung (Regeln 4.15 und 90.4) ist der Antrag

- a) ☐ nicht unterzeichnet.
- b) ☐ nicht von allen Anmeldern unterzeichnet.
- c) ☐ ohne die in der Kontrollliste in Feld Nr. VIII des Antrags genannte Erklärung mit der Begründung für das Fehlen der Unterschrift eines Anmelders bei Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika eingereicht worden.
- d) ☒ zwar von dem vorgeblichen Anwalt/gemeinsamen Vertreter unterzeichnet, doch kann dieser nicht als solcher gelten, da
 - ☐ der internationalen Anmeldung keine Vollmacht über seine Bestellung beigelegt ist.
 - ☒ die der internationalen Anmeldung beigelegte Vollmacht nicht von allen Anmeldern unterzeichnet ist.
- e) ☐ Sonstiges (bitte erläutern) :

* Alle Anmelder einschliesslich der Erfinder, falls diese auch Anmelder sind (z.B. wenn die Vereinigten Staaten von Amerika bestimmt werden), müssen unterzeichnen.

2. Hinsichtlich der Angaben über den Anmelder (Regeln 4.4 und 4.5) gibt der Antrag

- a) ☐ den Namen des Anmelders nicht ordnungsgemäss an (bitte erläutern) :
- b) ☐ die Anschrift des Anmelders nicht an.
- c) ☐ die Anschrift des Anmelders nicht ordnungsgemäss an (bitte erläutern) :
- d) ☐ die Staatsangehörigkeit des Anmelders nicht an.
- e) ☐ den Sitz oder Wohnsitz des Anmelders nicht an.
- f) ☐ Sonstiges (bitte erläutern) :

3. Sprache anderer Teile der internationalen Anmeldung als die Beschreibung und die Patentansprüche (Regeln 12.1 c) und 26.3ter a) und c))

- a) ☐ Der Antrag ist nicht in einer Sprache abgefasst, die sowohl vom Anmeldeamt zugelassen ist als auch eine Veröffentlichungssprache ist, nämlich: deutsch, englisch oder französisch.
- b) ☐ Die Textbestandteile der Zeichnungen sind nicht in der Sprache abgefasst, in der die internationale Anmeldung zu veröffentlichen ist, nämlich: deutsch.
- c) ☐ Die Zusammenfassung ist nicht in der Sprache abgefasst, in der die internationale Anmeldung zu veröffentlichen ist, nämlich: deutsch.

4. Die Bezeichnung der Erfindung

- a) ☐ ist in Feld Nr. 1 des Antrags nicht angegeben (Regel 4.1 a)).
- b) ☐ ist oben auf dem ersten Blatt der Beschreibung nicht angegeben (Regel 5.1 a)).
- c) ☐ in Feld Nr. I des Antrags ist nicht mit der Bezeichnung in der Überschrift der Beschreibung identisch (Regel 5.1 a)).

5. Zusammenfassung (Regel 8)

- ☐ Die internationale Anmeldung enthält keine Zusammenfassung.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
43222-22

Absenddatum
(Tag/Monat/Jahr) 15/09/2000

WEITERES VORGEHEN siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05127

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr) 05/06/2000

Anmelder


LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.
Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:
Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?
Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?
Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20.
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.
2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.
3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüros dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.
☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.
4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:
Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{ter} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.
Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.
Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüros vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter
Andria Overbeeke-Siepkas

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 29 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu nummerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Nummerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 52.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.



EPA / EPO / OEB
D - 80298 München
089 / 2399 - 0
Tx 523 656 epmu d
Fax 089 / 2399 - 4465

Europäisch s
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

EPA / EPO / OEB : D-80298 München

SIEMONS, Norbert, Dr.
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg

DE

Nr. der Anmeldung / Application No. / Demande de brevet no

PCT/EP 00 / 05127

Tag des Eingangs / Date of receipt / Date de réception

05.06.2000

Zeichen des Anmelders / Vertreter - Applicant / Representative ref. no. -
Référence du demandeur ou du mandataire

43 222-22

S. 27/10/00

Anmelder / Applicant / Demandeur : LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG

Datum / Date 06.06.2000

Empfangsbescheinigung / Receipt for documents / Récépissé de documents

Das Europäische Patentamt bescheinigt hiermit den Empfang folgender Dokumente:
The European Patent Office hereby acknowledges the receipt of the following:
L'Office européen des brevets accuse réception des documents indiqués ci-dessous:

A. Internationale Anmeldung / International application / Demande internationale

Stückzahl / No. of
copies / Nombre
d'exemplaires

☒ Antrag / Request / Requête

1

☒ Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil)
Description (excluding sequence listing part)
Description (sauf partie réservée au listage des
séquences

1

☒ Patentansprüche / Claim(s) / Revendication(s)

1

☒ Zusammenfassung / Abstract / Abrégé

1

☐ Zeichnung(en) / Drawing(s) / Dessin(s)

☐ Sequenzprotokollteil der Beschreibung
Sequence listing part of description
Partie de la description réservée au listage des
séquences

☐ Diskette / Disquette

☒ Kopie der allgemeinen Vollmacht
Copy of general power of attorney
Copie du pouvoir général

☐ Prioritätsbeleg(e)
Priority document(s)
Document(s) de priorité

☒ Blatt für die Gebührenberechnung
Fee calculation sheet
Feuille de calcul des taxes

☐ Abbuchungsauftrag
Debit order
Ordre de débit

Währung/Currency/Monnaie
Betrag/Amount/Montant

EUR 2160

☐ Scheck
Cheque
Chèques

Ausfüllung freigestellt /
Optional / facultatif

☒ Sonstige Unterlagen (einzeln auflisten)
Other documents (specify)
Autres documents (préciser)

B. Beigefügte Dokumente / Accompanying documents / Éléments joints

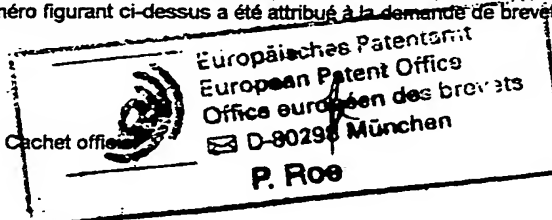
☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Separate signed power of attorney
Pouvoir distinct signé

Form PCT/RO/134

Anlage 1, 2 und 3

Die genannten Unterlagen sind am oben genannten Tag eingegangen. Die in der Kontrollliste (Feld VIII) des PCT-Antragformulars RO/101 angegebenen Blattzahlen wurden bei Eingang nicht geprüft. Die Anmeldung hat ebenfalls oben angeführte Anmeldenummer erhalten / The said items were received on the date indicated above. No check was made on receipt that the number of sheets indicated in the check list (box VIII) of the PCT Request Form RO/101 were correct. The application has been assigned the above-indicated application number / Les documents mentionnés ont été reçus à la date indiquée. L'exactitude du nombre de feuilles indiqué au bordereau (cadre VIII) du formulaire de requête PCT RO/101 n'a pas été contrôlée lors du dépôt. Le numéro figurant ci-dessus a été attribué à la demande de brevet.

Unterschrift / Amtsstempel / Signature / Official Stamp / Signature / Cachet officiel



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: ANMELDEAMT

PCT

An

Siemons, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

MITTEILUNG DES INTERNATIONALEN
AKTENZEICHENS UND DES
INTERNATIONALEN ANMELDEDATUMS

(Regel 20.5.c) PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

28. 06. 2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43 222-22

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/ 05127

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

04/06/1999

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG

Bezeichnung der Erfindung

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationalen Anmeldung das oben genannte internationale Aktenzeichen und internationale Anmeldedatum zuerkannt worden ist.
2. Weiterhin wird dem Anmelder mitgeteilt, daß das Aktenexemplar der internationalen Anmeldung dem Internationalen Büro am oben angegebenen Absendedatum übermittelt worden ist.
3. ☐ Sonstiges:

* Das Internationale Büro überwacht die Übermittlung des Aktenexemplars durch das Anmeldeamt und unterrichtet den Anmelder über dessen Eingang (mit Formblatt PCT/IB/301). Ist das Aktenexemplar bei Ablauf des vierzehnten Monats nach dem Prioritätsdatum noch nicht eingegangen, teilt das Internationale Büro dies dem Anmelder mit (Regel 22.1.c)).

Name und Postanschrift des Anmeldeamts



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

G. Koestel

PATENT- U. RECHTSANW. POSTFACH 30 24 30 20308 HAMBURG

Telefax

An das
Europäische Patentamt

80298 München

Fax – Nr.: 089 2399 4465

EDO GRAALFS, Dipl.-Ing.
NORBERT SIEMONS, Dr.-Ing.
PETER SCHLOBERG, Dr., Dipl.-Phys.
HEIDI REICHERT, Rechtsanwältin
Neuer Wall 41, 20354 Hamburg
Postfach 30 24 30, 20308 Hamburg
Telefon (040) 36 67 55, Fax (040) 36 40 39
E-mail hamburg@negendank-patent.de

HANS HAUCK, Dipl.-Ing. (P)
WERNER WEHNERT, Dipl.-Ing.
Mozartstraße 23, 80330 München
Telefon (089) 53 92 30, Fax (089) 53 12 39
E-mail munich@negendank-patent.de

WOLFGANG DÖRING, Dr.-Ing.
Mörkestraße 18, 40474 Düsseldorf
Telefon (0211) 45 07 35, Fax (0211) 454 32 83
E-mail duesseldorf@negendank-patent.de

ZUSTELLUNGSANSCHRIFT/ PLEASE REPLY TO:

HAMBURG, 03. September 2001

Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05127
Anmelder: Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG
Anwaltsakte: 43 222-22

Auf den schriftlichen Bescheid gemäß Regel 66 PCT vom 18. April 2001:

1. Anspruchsänderungen

Anliegend wird ein Vorschlag für neu gefaßte Ansprüche 1 bis 28 eingereicht, die einer weiteren Prüfung unterzogen werden sollen.

Anspruch 1 ist durch zusammenfassen der bisherigen Ansprüche 1 und 2 entstanden. Ferner wurde einbezogen, daß das Fusionsprotein ein N-terminales His-Tag aufweist, entsprechend Seite 8 der Beschreibung.

... 2

Der bisherige Anspruch 2 ist weggefallen.

Die Ansprüche 2 bis 5 sind aus den bisherigen Ansprüchen 3 bis 6 entstanden. Dabei wurden in Anspruch 5 entsprechende Änderungen wie in Anspruch 1 vorgenommen. Zudem wurde in Anspruch 5 auf die Verwendung der Stoffzusammensetzung gegen die Ödemkrankheit der Tiere Bezug genommen.

Der bisherige Anspruch 6 ist weggefallen.

Die Ansprüche 6 bis 18 sind aus den bisherigen Ansprüchen 8 bis 20 hervorgegangen.

Dabei wurde Anspruch 11 entsprechend Anspruch 1 ergänzt. Außerdem wurde in Anspruch 11 das bisherige „und/oder“ durch „und wahlweise“ ersetzt.

Anspruch 13 wurde ebenfalls entsprechend Anspruch 1 ergänzt. Zudem wurde in Anspruch 13 die Größe des Tag wie in Anspruch 1 definiert.

Die Rückbeziehung von Anspruch 15 wurde auf die Ansprüche 1 bis 4 eingeschränkt.

Anspruch 18 wurde ebenfalls entsprechend Anspruch 1 ergänzt. Außerdem wurde einbezogen, daß das Stx2e-Operon für das Fusionsprotein codiert. Zur ursprünglichen Offenbarung wird insbesondere auf Seite 8 und das Beispiel in der Beschreibung verwiesen.

Der bisherige Anspruch 21 ist weggefallen.

Die Ansprüche 19 bis 28 sind aus den Ansprüchen 22 bis 31 hervorgegangen.

Dabei wurde Anspruch 26 auf die Ansprüche 1 bis 5 rückbezogen.

2. Zu Sektion VIII. des Prüfungsbescheides:

- 2.1 Anspruch 5 (früher 6) wurde hinsichtlich der Verwendung der Stoffzusammensetzung klargestellt. Zur ursprünglichen Offenbarung wird auf Seite 3 der Beschreibung hingewiesen.
- 2.2 Anspruch 11 (früher 13) bezieht sich auf eine Impfstoffzusammensetzung, in der das Fusionsprotein obligatorisch enthalten ist und das zusätzliche Antigen fakultativ. Damit ist die Übereinstimmung mit Anspruch 5 (früher 6) hergestellt.
- 2.3 In Anspruch 13 (früher 15) wurde die Größe des terminalen Tag entsprechend Anspruch 1 festgelegt, so daß der Einwand der Nicht-Einheitlichkeit überwunden ist.
- 2.4 In Anspruch 15 (früher 17) wurde die Rückbeziehung korrigiert, so daß diese nunmehr ausschließlich auf ein Fusionsprotein gerichtet ist.
- 2.5 In Anspruch 20 (früher 23) wurde klargestellt, daß der Stx2e-Operon für das Fusionsprotein codiert, so daß das Fusionsprotein durch Expression und Reinigung erhältlich ist.
- 2.6 Anspruch 26 (früher 29) wurde auf die Fusionsproteine gemäßen Ansprüchen 1 bis 4 rückbezogen, so daß der fragliche Rückbezug auf den früheren Anspruch 20 entfallen ist.

3. Zu Sektion V. des Prüfbescheides

- 3.1 Die WO98/11229 (Druckschrift 1) offenbart ausschließlich His-Tag-Fusionen mit vollständigen Toxinen. Außerdem findet sich unter den in dieser Schrift aufgelisteten rekombinanten Plasmiden keines mit dem Stx2e, das für das klinische Bild der Ödemkrankheit der Schweine verantwortlich ist. Lediglich andere Mitglieder der Stx2-Gruppe sind in dieser Schrift verwendet worden, die für verschiedene Krankheitsgeschehen bei verschiedenen Tierarten

verantwortlich sind. Die Mitglieder der Stx2-Gruppe verursachen jedoch nicht die Ödemkrankheit der Tiere.

Der Anmeldungsgegenstand bezieht sich hingegen auf die B-Untereinheit des Stx2e-Toxins zudem in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag. Die Schrift nimmt das anmeldungsgemäße Fusionsprotein weder neuheitsschädlich vorweg, noch zeigt sie einen naheliegenden Weg zum Auffinden dieses Fusionsproteins auf.

- 3.2 Die WO96/30043 (Druckschrift 2) beschreibt Fusionsproteine, die aus einem Fragment des Vero-Toxins VT2e und einem C-terminalen His-Tag bestehen können. Diese Konstrukte werden benutzt, um Eiantikörper über die Spezies Huhn zu erzeugen, die für eine passive Immunisierung gegen das beim Menschen vorkommende HUS genutzt werden können.

Der Anmeldungsgegenstand bezieht sich hingegen auf die B-Untereinheit des Vero-Toxins VT2e (=Stx2e) sowie einen N-terminalen His-Tag für die aktive Immunisierung gegen die Ödemkrankheit der Schweine. Auch insoweit ist Neuheit und erfinderische Tätigkeit gegeben, da dem Fachmann keine Anregung zu der Erfindung gegeben wurde.

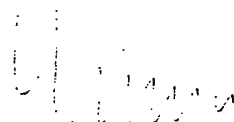
- 3.3 Die FR-A-2 766 193 (Druckschrift 3) betrifft Polypeptide, die das Fragment B des Shiga-Toxins und weitere Fragmente enthalten. Tags werden hier nicht beschrieben. Auch gegenüber dieser Schrift ist der Erfindungsgegenstand neu. Eine Anregung zum Auffinden der Erfindung wurde dem Fachmann ebenfalls nicht gegeben.
- 3.4 Infection and Immunity (Druckschrift 4) geht auf Shiga-Toxin-Untereinheiten ein, allerdings ohne His-Tag-Fusionsproteine zu erwähnen.

Dem gegenüber ist der Erfindungsgegenstand ebenfalls ersichtlich neu und beruht aus einer erfinderischen Tätigkeit.

3.5 Veterinary Microbiology (Druckschrift 5) wurde bereits in der Beschreibungseinleitung zitiert. Darin ist ein Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Glutathion-S-Transferase von Shistosoma Japonicum beschrieben. Demgegenüber ist der Anmeldungsgegenstand ebenfalls ersichtlich neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

3.6 Die deutsche Tierärztliche Wochenzeitschrift (Druckschrift 6) betrifft ebenfalls die in der Beschreibungseinleitung bereits zitierte Kombination eines Fragmentes der B-Untereinheit des Shiga-Toxins mit Glutathion-S-Transferase. Die Bewertung ist dieselbe wie in 3.5.

Es wird um einen weiteren Prüfungsbescheid unter Berücksichtigung der durch die neuen Ansprüchen verdeutlichten Unterschiede des Anmeldungsgegenstandes vom ermittelten Stand der Technik gebeten.



Patentanwalt
Dr. N. Siemons

JC13 Rec'd PCT/PTO 03 DEC 2001

A n s p r ü c h e

1. Rekombinantes Fusionsprotein mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht.
2. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1 kDa.
3. Rekombinantes Fusionsprotein nach Ansprüche 1 oder 2 mit einem aminoterminalen His-Tag.
4. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Anspruch 1 bis 3 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
5. (Impf-)Stoffzusammensetzung zur Impfung und/oder Diagnostik bei der Ödemkrankheit der Tiere, insbesondere Säugetiere, vor allem Schweine, mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht.
6. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 5 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1 kDa.
7. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6 mit einem aminoterminalen His-Tag.
8. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 7 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.

9. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, die ein zusätzliches Antigen oder mehrere zusätzliche Antigene umfaßt.
10. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das eine oder mehrere zusätzliche Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Pasteurella multocida-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem Bordetella bronchiseptica-Bacterin, einem Erysipelothrix rhusiopathiae-Antigen, einem oder mehreren löslich zellfreien Toxoiden von Pasteurella multocida Typ D und/oder Escherichia coli und/oder Clostridium perfringens, inaktivierten ganzen Zellen von Pasteurella multocida Typ A oder D, Kulturen von Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Streptokokkus suis, Mycoplasma hyopneumoniae sowie Procine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus, Influenzavirus, Pseudorabiesvirus und Porcine Circovirus I und II.
11. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 10, die die B-Untereinheit (Stx2e) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag und wahlweise mindestens ein zusätzliches Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen umfaßt.
12. Impfstoffzusammensetzungen nach einem der Ansprüche 5 bis 11 in Zusammensetzungen und Mengen, so daß sie bei sequentieller und/oder gleichzeitiger Impfung von Schweinen diese gegen die Ödemkrankheit

der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen immunisieren.

13. (Impf-)Stoffzusammensetzung mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht, insbesondere nach einem der Ansprüche 5 bis 12, in einer W/O/W-Emulsion, in einer O/W-Emulsion, in einer W/O-Emulsion oder in einer wäßrigen Suspension.
14. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 13 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (iFA).
15. Plasmid enthaltend DNA, die ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert.
16. E.Coli-Stamm, transformiert mit einem Plasmid gemäß Anspruch 15.
17. E.coli-Stamm gemäß Anspruch 16, hinterlegt bei der DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH- unter der Nummer DSM 12721.
18. Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, bei dem in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert wird die für die B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit dem N-terminalen His-Tag codiert, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E.coli-Stamm transformiert wird, das entstandene

Expressionssystem induziert wird und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt wird.

19. Verfahren nach Anspruch, bei dem das terminale Tag eine Größe von maximal 1kDa hat.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, bei dem das terminale Tag ein aminoterminalen His-Tag ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, bei dem die Expressionskultur einer Lysepufferbehandlung unterzogen wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, bei dem die Expressionskultur einer Behandlung in einer French Press oder mittels Ultraschall unterzogen wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, bei dem die Expressionskultur nach Behandlung mit der French Press oder mittels Ultraschall und/oder mit Lysepuffer einer Affinitätschromatografischen Reinigung zugeführt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem die Reinigung mittels einer FPLC durchgeführt wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, bei dem das gereinigte Fusionsprotein vernetzt wird.

26. Verfahren bei dem durch Fusion von Milzzellen von unter Verwendung des rekombinanten Fusionsproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 immunisierten Mäusen mit Myelomzellen Hybridoma-Klone für die Herstellung von Anti-Stx2eB-Immunglobulinen erzeugt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die mittels der Hybridoma-Klone produzierten Antikörper zur in-process-Kontrolle für die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine verwendet werden.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, bei dem die von den Hybridoma-Klonen produzierten Antikörper für ein immunaffinitätschromatografisches Reinigungsverfahren für das Stx2e-Holotoxin verwendet werden.

Applicant's or agent's
file reference

43 222-22

International application No.

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description
on page 17, line 2 to 9

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT

Further deposits are identified on an additional sheet ☐

Name of depositary institution

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Address of depositary institution (including postal code and country)

Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig/DE

Date of deposit

1999-03-09

Accession Number

DSM 12721

C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)

This information is continued on an additional sheet ☐

The scientific designation, the characteristics of the microorganisms, the receipt for the documents, and the certificate of viability issued by the place of lodgement ensue from the following documents:

The declaration made during the applicant's first deposit on March 5/8, 1999,
along with Annexes (Annex 1);

The receipt for the documents issued during the first deposit of the DSMZ on March 11, 1999
(Annex 2);

The certificate of viability issued by the DSMZ on March 11, 1999 (Annex 3)

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

For receiving Office use only

☐

This sheet was received with the international application

Authorized officer

For International Bureau use only

☐

This sheet was received by the International Bureau on:

Authorized officer

BUDAPEST AGREEMENT ON THE INTERNATIONAL
ACCEPTANCE OF DEPOSITS OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURES

DECLARATION MADE FOR THE FIRST DEPOSIT

(RULE 6.1)

THE DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN
GmbH
Mascheroder Weg 1b
D – 38124 Braunschweig

To be completed by the office of lodgement:
DSMZ No. of receipt:
Date of receipt of the culture:

BACTERIA / FUNGI¹

THE UNDERSIGNED DEPOSITS THE MICROORGANISM REFERENCED TO BELOW
BECAUSE OF THE BUDAPEST AGREEMENT AND COMMITS HIMSELF NOT TO
WITHDRAW THE DEPOSITION DURING THE PERIOD INDICATED IN THE RULE 9.1.²

DESIGNATION OF THE MICROORGANISM

Reference No.³: Cux-SLT-II_c-B

The culture to be deposited is:

(x) a pure culture

Taxonomical designation⁴: E.coli BL21 (DE3) / SLT-II_c-B () a mixed culture

II. CONDITIONS OF GROWTH

()⁵

Medium:

pH prior to sterilization

Sterilization min at °C

pH after sterilization:

Behaviour to oxygen:

() aerobic

() micro-aerophilic

() obligately anaerobic

Particular demands to the gas atmosphere:

Incubation temperature: °C

Period of incubation:

To be kept at °C

VII. INDICATIONS ON THE GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM**()⁵****1. INDICATIONS ON THE RECEPTOR ORGANISM**

Designation: E.coli BL 21 (DE3) (NOVAGEN)
Risk group: (x) RG1 () RG2
Sensitivities: Rifampicin
Resistances:
Auxotrophies:

Particular properties: lon⁻ omp T⁻
(e.g. restriction modification system,
general genetic recombination)

2. INDICATIONS ON THE DONOR ORGANISM

Designation: E.coli 0138:K81 E57

Risk group: () RG1 (x) RG2 () RG3

Description of the cloned DNA fragment:

Informative content: Sub-genic fragment of the B sub-unit of Stx2e
Size (in bp): 228 bp

() complete genom () cDNA
() sub-genomic () synthetic
(x) sub-genic

Hazard potential of the cloned DNA: () pathogenic () tumorigenic
() toxigenic () allergenic

(x) No hazard potential

3. INDICATIONS ON THE VECTOR

Designation: pET-15b (Novagen)

Derivative of:

Host specific feature: E. coli

Resistances: Ampicillin

Size (inc. insert): 5936 bp

Promoters: T7 promotor

More existing read frames: lac I

Indications on mobilizing capacity and inherent transfer systems:

Indications on inherent infectiousness:

Possible transfer by endogeneous helper viruses:

4. INDICATIONS ON GVO¹:

Particular properties: Production of a subgenic fragment
(e.g. production of: Used as a.... vector, etc) of the B sub-unit of Stx2e

External DNA: () chromosomally integrated (x) episomal

Hazard potential: () pathogenic () tumorigenic
() toxigenic (allergenic)

(x) No hazard potential

Please justify: The B sub-unit is not toxigenic

According to GenTG^o, the deposit of a genetically modified safety stage 2 organism can become effective only if the depositing institution sends the DMSZ a copy of the results of the safety check made by the competent authority.

VIII. SCIENTIFIC DESCRIPTION ⁷ :	(x) ⁵
IX. MORE INDICATIONS ⁸ :	() ⁹
X. WHEREABOUTS OF THE CULTURE AFTER THE PRESCRIBED PERIOD OF PRESERVATION ¹⁰ :	
a) The culture is to be transferred to the stock of the DSMZ public collection () Yes () No	
b) The culture is to be returned to the depositing institution against a fee: (x) Yes () No	
c) The culture is to be destroyed by the DSMZ () Yes () NO	
XI. DEPOSITING INSTITUTION ¹¹ :	
Name:	Signature:
Address:	Date:

Supplementary indications relating to the genetically modified organism

I. Indications on the external DNA

Sub-genic fragment of the B sub-unit of the 2e Shiga toxin (StxB2e)

Shiga toxin forming *Escherichia coli* (STEC) are associated with intestinal and extra-intestinal diseases of human beings and animals. Amongst others, these include the oedematose of the pigs which is caused by the Stx2e. The STEC produce Shiga toxins which are considered a significant factor in pathogenesis. A distinction is made between two toxin types: Stx1 and Stx2 (with several variants to which also the Stx2e belongs). All Stx have characteristic features in common: They comprise an enzymatically active A sub-unit and a pentamer of B sub-units which is answerable for the receptor bonding (O'Brien, 1989). The way of action of the Stx has been characterized very well. After the bonding to the host cell brought about with the aid of the B sub-unit, the toxin is received and is split up by a protease. This forms the toxic A1 sub-fragment which inhibits the protein biosynthesis by inactivating the 60S sub-unit of the ribosome. The remaining portion of the toxin, i.e. the carboxy-terminal fraction of the A sub-unit (A2 sub-fragment) with the pentamer of the B sub-units bonded thereto, is not cytotoxic.

Since the diseases caused by Stx take an acute or peracute course in many cases a prophylaxis in the sense of an immunization is highly desirable. What was demonstrated in tests with a chemically modified Stx2e holotoxin (Awad-Masalmeh, 1989) and a recombinantly modified one (Gordon, 1992) was that the toxin in vivo induces neutralizing antibodies which can provide protection from cell damage. However, a problem encountered in these tests was that the proteins employed partly exhibited a residual toxicity. For this reason, several working teams focussed on the isolated Stx-B sub-unit as an immunogenic substance because it imparts the receptor

bonding of the toxin and is not toxic per sé. It was shown that if there is an infection by Stx2e-forming *E.coli* antibodies will be formed against the B sub-unit (Franke et al., 1994). The GVO *Escherichia coli* BL21 [pHIT-24] which has the capability of expressing the B sub-unit of Stx2e serves for generating a recombinant vaccine against the oedematose of the pigs.

Awad-Masalmeh et al., 1989, Dt. Tierärztl. Wochenschr. 96: 397-432

Boyd et al., 1991, Infect.immun. 59: 750-757

Franke et al., 1994. Vet.Microbiol. 60: 485-490

O'Brien and Holmes, 1987, Microbiol. Rev. 51: 206-220

II. Indications on the vector

Plasmid pET-15b

Risk evaluation: **Risk group 1**

Reasons:

The expression vector pET-15b is a commercially distributed plasmid vector which can be multiplied in E.coli K12 strains. Its nucleotide sequence and its genetic organization are completely known. The vector bears generally common selection markers (resistance to Ampicillin), but has no virulence or pathogeneity-determining sequences.

III. Indications on the receptor

Escherichia coli BL21(DE3)

Risk evaluation: **Risk group 1**

Reasons:

The E-coli strain used as a receptor is a derivative of Escherichia coli K12. E. coli K12 derivatives are assigned to the risk group 1 in Annex 1, Part B, GenTSV and are certified, with an appropriate vector, as a biological safety measure B 1 (Annex II A, GenTSV). The strains used are genetically modified K12 derivatives the safety-relevant properties of which were not affected by the modifications (genetic

stability, missing colonization capability outside defined environmental conditions, apathogeneity for human beings, animals, and plants, harmlessness to the environment, low-scale gen exchange with other organisms). The K12 derivatives continue to meet the requirements of biological safety measures as before (§ 6, para 4 GenTSV).

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

D – 27472 Cuxhaven

P082 99/H

254

11/03/1999

Dear Sirs,

Deposit of microorganisms according to the Budapest Agreement

You will find enclosed our confirmation of receipt and certificate of viability for

Escherichia coli Cux-SLT-II_e-B-DSM 12721

and our invoice 9901265.

With kind regards,

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikro-
organismen und Zellkulturen GmbH

Dr. Vera Weihs

Note: You will be supplied with specimens for verification after the preservation of the strain.


INTERNATIONAL FORM

Attachment 2

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Cux-SLT-II _e -B	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12721
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> (X) a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1999-03-09 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1999-03-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
COGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Attachment 3

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG Address: Heinz-Lohmann-Str. 4 27472 Cuxhaven		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12721 Date of the deposit or the transfer ¹ : 1999-03-09	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1999-03-09 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weicks</i> Date: 1999-03-11	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Dr. Norbert Siemons.....
(insert translator's name)

of Neuer Wall 41, D-20354 Hamburg/Federal Republic of Germany.....
.....
(translator's address)

declare as follows:

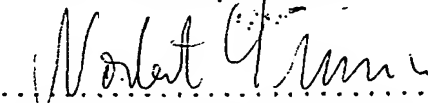
1. That I am well acquainted with both the English and German.....
languages, and
2. That the attached document is a true and correct translation made
by me to the best of my knowledge and belief of:-

(b) The Amendments made to the specification
International Application No. PCT/EP00/05127.....

December 27, 2001

.....
(Date)

Dr. Norbert Siemons


.....
(Signature of Translator)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

4

Applicant's or agent's file reference 43 222-22	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05127	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/62		
Applicant LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 21 November 2000 (21.11.00)	Date of completion of this report 13 September 2001 (13.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05127

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-17, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-28, filed with the letter of 05 September 2001 (05.09.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-28	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-28	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject of present Claims 1-28 is anticipated by the teaching of citation WO-A-98/11229 (1) (see e.g. page 10, Example 1), since according to the wording of the present claims the presence of the A subunit is not excluded. Accordingly, the present claims also cover N-terminal His-tag fusions with complete Stx2eB toxins.

Furthermore, the involvement of an inventive step can likewise not be recognised, since the principle underlying the present application (preparation of a Shiga toxin fusion protein based on the B subunit of this toxin and an N-terminal tag and its use as a vaccine) is already proposed in the prior art (see WO-A-96/30043 (2), e.g. page 13, and Veterinary Microbiology, Vol. 43 (1995), pages 41-52, Franke S. et al. (3)). The essential difference between the fusion protein according to the invention and the fusion protein described in (3) seems to lie only in the replacement of the glutathion S-transferase with a His-tag. This substitution, particularly in view of the teaching of (1) and in the light of general expert knowledge, can be regarded merely as an alternative obvious to a person skilled in the art

and not involving any inventive step. In the absence of any comparative tests documenting that this substitution lends the claimed fusion protein **unexpected** properties or effects compared to that described in (3), therefore, the present claims fail also to comply with PCT Article 33(3).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. In view of the wording of new Claim 1, Claim 3 appears to be superfluous. The same applies to Claim 20.
2. The word "optionally" inserted in Claim 11 does not appear to have a basis in the application as filed (PCT Article 34(2)(b)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The words "approximately" and "fraction" used *inter alia* in Claim 1 are vague and thereby render the scope of claims containing either of these words unclear.
2. According to Claim 17 the *E. coli* strain filed under number DSM 12721 contains a plasmid which encodes the fusion protein according to the invention. This however is inconsistent with the description, according to which the said *E. coli* strain encodes only the B subunit Stx2eB (see the example shown in the application). In this context it is also noted that according to the present examples there is no His-tag on the N-terminal end of the B subunit.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 43 222-22	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/62		
Anmelder LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 21/11/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter SCHEFFZYK, I Tel. Nr. +49 89 2399 3602 

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SIEMONS, Norbert
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg
ALLEMAGNE

Eingang Hamburg

14. SEP. 2001

erl.

not.....

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

13.09.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

43 222-22

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP00/05127

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

05/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

04/06/1999

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Hingel, W

Tel. +49 89 2399-8717



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-17 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-28 eingegangen am 05/09/2001 mit Schreiben vom 03/09/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-28
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-28
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-28
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

SEKTION V-----

Der Gegenstand vorliegender Ansprüche 1-28 wird durch die Lehre der Entgegenhaltung WO 98/11229 (1) (siehe z.B. Seite 10, Beispiel 1) neuheitsschädlich vorweggenommen, denn gemäß dem Wortlaut vorliegender Ansprüche ist die Anwesenheit der A-Untereinheit nicht ausgeschlossen. Demnach umfassen vorliegende Ansprüche auch N-terminale His-Tag Fusionen mit vollständigen Stx2eB Toxinen.

Darüberhinaus kann auch das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit nicht anerkannt werden, denn das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Prinzip (Bereitstellung eines Shiga Toxin Fusionsproteins basierend auf der B-Untereinheit dieses Toxins und einem N-terminalen Tag sowie dessen Verwendung als Impfstoff) wird bereits im Stand der Technik vorgeschlagen (siehe WO 96/30043 (2), z.B. Seite 13 und Veterinary Microbiology 43, (1995), 41-52, Franke S. et al., (3)). Der wesentliche Unterschied zwischen dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein und dem in (3) beschriebenen Fusionsprotein scheint lediglich in dem Ersatz der Gluthation-S-Transferase durch ein His-Tag zu bestehen. Dieser Austausch kann, insbesondere im Hinblick auf die Lehre von (1) sowie unter Berücksichtigung des allgemeinen Fachwissens lediglich als für einen Fachmann naheliegende Alternative betrachtet werden, die auf keiner erfinderischen Tätigkeit beruht. In Abwesenheit von Vergleichsversuchen, die belegen, dass durch diesen Austausch dem beanspruchten Fusionsprotein im Vergleich zu dem in (3) beschriebenen **unerwartete** Eigenschaften/Effekte verliehen werden erfüllen daher vorliegende Ansprüche auch nicht das Erfordernis des Art. 33(3) PCT.

SEKTION VII-----

- 1). Im Hinblick auf den Wortlaut des neu-eingereichten Anspruchs 1 scheint Anspruch 3 überflüssig zu sein. Das gleiche gilt entsprechend für Anspruch 20.
- 2). Für den in Anspruch 11 eingeführten Begriff "wahlweise" kann in den ursprünglichen Anmeldungsunterlagen keine Basis gefunden werden (Art.

34(2)(b) PCT).

SEKTION VIII-----

- 1). Die u.a. in Anspruch 1 verwendeten Begriffe "etwa" sowie "Bruchteils" sind vage und machen damit den Schutzzumfang von Ansprüchen, die zumindest einen dieser Begriffe enthalten unklar.
- 2). Gemäß Anspruch 17 enthält der unter der Nummer DSM 12721 hinterlegte E.coli Stamm ein Plasmid, das das erfindungsgemäße Fusionsprotein kodiert. Dies ist jedoch nicht in Übereinstimmung mit der Beschreibung, gemäß welcher der besagte E.coli Stamm lediglich die B-Untereinheit Stx2eB kodiert (siehe das in der Anmeldung gezeigte Beispiel). Diesbezüglich wird ferner festgestellt, das gemäß den vorliegenden Ausführungsbeispielen kein His-Tag an das N-terminale Ende der B-Untereinheit fusioniert wird.

JG13 Rec'd PCT/PTO 03 DEC 2001

Ansprüche

1. Rekombinantes Fusionsprotein mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht.
2. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1 kDa.
3. Rekombinantes Fusionsprotein nach Ansprüche 1 oder 2 mit einem aminoterminalen His-Tag.
4. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Anspruch 1 bis 3 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
5. (Impf-)Stoffzusammensetzung zur Impfung und/oder Diagnostik bei der Ödemkrankheit der Tiere, insbesondere Säugetiere, vor allem Schweine, mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht.
6. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 5 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1kDa.
7. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6 mit einem aminoterminalen His-Tag.
8. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 7 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.

.../2

- 2 -

9. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, die ein zusätzliches Antigen oder mehrere zusätzliche Antigene umfaßt.
10. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das eine oder mehrere zusätzliche Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem *Pasteurella multocida*-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem *Bordetella bronchiseptica*-Bacterin, einem *Erysipelothrix rhusiopathiae*-Antigen, einem oder mehreren löslich zellfreien Toxoiden von *Pasteurella multocida* Typ D und/oder *Escherichia coli* und/oder *Clostridium perfringens*, inaktivierten ganzen Zellen von *Pasteurella multocida* Typ A oder D, Kulturen von *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptokokkus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* sowie *Procine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus*, *Influenzavirus*, *Pseudorabiesvirus* und *Porcine Circovirus I und II*.
11. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 10, die die B-Untereinheit (Stx2e) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag und wahlweise mindestens ein zusätzliches Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen umfaßt.
12. Impfstoffzusammensetzungen nach einem der Ansprüche 5 bis 11 in Zusammensetzungen und Mengen, so daß sie bei sequentieller und/oder gleichzeitiger Impfung von Schweinen diese gegen die Ödemkrankheit

.../3

- 3 -

der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen immunisieren.

13. (Impf-)Stoffzusammensetzung mit einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, dessen Größe etwa der Größe der B-Untereinheit oder eines Bruchteils der B-Untereinheit entspricht, insbesondere nach einem der Ansprüche 5 bis 12, in einer W/O/W-Emulsion, in einer O/W-Emulsion, in einer W/O-Emulsion oder in einer wäßrigen Suspension.
14. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 13 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (iFA).
15. Plasmid enthaltend DNA, die ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert.
16. E.Coli-Stamm, transformiert mit einem Plasmid gemäß Anspruch 15.
17. E.coli-Stamm gemäß Anspruch 16, hinterlegt bei der DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH- unter der Nummer DSM 12721.
18. Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag, bei dem in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert wird die für die B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e in Fusion mit dem N-terminalen His-Tag codiert, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E.coli-Stamm transformiert wird, das

.../4

- 4 -

entstandene Expressionssystem induziert wird und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt wird.

19. Verfahren nach Anspruch, bei dem das terminale Tag eine Größe von maximal 1kDa hat.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, bei dem das terminale Tag ein aminoterminales His-Tag ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, bei dem die Expressionskultur einer Lysepufferbehandlung unterzogen wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, bei dem die Expressionskultur einer Behandlung in einer French Press oder mittels Ultraschall unterzogen wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, bei dem die Expressionskultur nach Behandlung mit der French Press oder mittels Ultraschall und/oder mit Lysepuffer einer affinitätschromatografischen Reinigung zugeführt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem die Reinigung mittels einer FPLC durchgeführt wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, bei dem das gereinigte Fusionsprotein vernetzt wird.

.../5

- 5 -

26. Verfahren bei dem durch Fusion von Milzzellen von unter Verwendung des rekombinanten Fusionsproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 immunisierten Mäusen mit Myelomzellen Hybridoma-Klone für die Herstellung von Anti-Stx2eB-Immunglobulinen erzeugt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die mittels der Hybridoma-Klone produzierten Antikörper zur in-process-Kontrolle für die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine verwendet werden.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, bei dem die von den Hybridoma-Klonen produzierten Antikörper für ein immunaffinitätschromatografisches Reinigungsverfahren für das Stx2e-Holotoxin verwendet werden.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75345 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/62,
C07K 14/245, A61K 38/16, C07K 16/12

Georg [DE/DE]; Ludwig-Rinn-Strasse 15, D-35452
Heuchelheim (DE). FRANKÉ, Sylvia [DE/DE];
Elly-Heuss-Knapp-Weg 18, D-35396 Gießen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05127

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juni 2000 (05.06.2000)

(74) Anwälte: SIEMONS, Norbert usw.; Neuer Wall 41,
D-20354 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BY, CN, HU, PL,
RU, UA, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
99110759.0 4. Juni 1999 (04.06.1999) EP

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO.
KG [DE/DE]; Heinz-Lohmann-Str. 4, D-27472 Cuxhaven
(DE).

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BALJER.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINANT FUSION PROTEIN, (VACCINE) COMPOSITION CONTAINING THE SAME AND METHOD
FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES FUSIONSPROTEIN, DIESES ENTHALTENDE
(IMPF-)STOFFZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a recombinant fusion protein, containing a subgenic Stx2e fragment of the Shiga toxin 2e
(Stx2e) in fusion with a terminal tag, whose size corresponds approximately to that of the fragment or to a fraction of said fragment.

(57) Zusammenfassung: Rekombinantes Fusionsprotein mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in
Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Grösse etwa der Grösse des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.

WO 00/75345 A1

In [redacted] Application No
PC [redacted] 00/05127

IPC 7 C12N15/62 C07K14/245 A61K38/16 C07K16/12

IPC 7 C07K C12N A61K

EPO-Internal

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.

X	WO 98 11229 A (HENRY M JACKSON FOUNDATION FOR) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document	I-31
---	---	------

X	WO 96 30043 A (OPHIDIAN PHARMACEUTICALS) 3 October 1996 (1996-10-03) page 13, line 13 - line 31; figure 10 page 25, line 4 - line 17; examples 6A, 6B page 18, line 4 - line 6	1-27
---	--	------

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Parent family members are listed in annex.

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

*E' earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2000

Date of mailing of the international search report

15/09/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eoa nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.
PCT/JP 00/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUNZER, F. ET AL.: "Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 10, October 1993 (1993-10), pages 2604-10, XP002120990 abstract page 2609, line 11 - line 12</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4219696 A		DE 59306342 D	05-06-1997
		DK 627006 T	03-11-1997
		WO 9316186 A	19-08-1993
		EP 0627006 A	07-12-1994
		ES 2104130 T	01-10-1997
		JP 7505052 T	08-06-1995

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 43222-22	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 05127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/06/1999
Anmelder LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/62 C07K14/245 A61K38/16 C07K16/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 11229 A (HENRY M JACKSON FOUNDATION FOR) 19. März 1998 (1998-03-19) das ganze Dokument ---	1-31
X	WO 96 30043 A (OPHIDIAN PHARMACEUTICALS) 3. Oktober 1996 (1996-10-03) Seite 13, Zeile 13 - Zeile 31; Abbildung 10 Seite 25, Zeile 4 - Zeile 17; Beispiele 6A, 6B Seite 18, Zeile 4 - Zeile 6 --- -/-	1-27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	VON WIELER, L.H. ET AL.: "Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absetzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-IIe." DEUTSCHE TIERARTZLICHE WOCHENZEITSCHRIFT, Bd. 102, Januar 1995 (1995-01), Seiten 40-43, XP002120988 Zusammenfassung Seite 42, mittlere Spalte, Zeile 7 - Zeile 13 ---	1-31
Y	WO 97 31117 A (UNIVERSITEIT MAASTRICHT ;BRUGGEMAN CATHARINA ANNA (BE); VINK CORNE) 28. August 1997 (1997-08-28) Seite 7, Zeile 9 - Zeile 15; Anspruch 2 ---	1-31
A	WO 96 12802 A (KINK JOHN A ;FIRCA JOSEPH R (US); PADHYE NISHA V (US); THALLEY BRU) 2. Mai 1996 (1996-05-02) das ganze Dokument ---	
A	FR 2 766 193 A (INST CURIE) 22. Januar 1999 (1999-01-22) ---	
A	DE 42 19 696 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 19. August 1993 (1993-08-19) ---	
A	ACHESON D W K ET AL: "EXPRESSION AND PURIFICATION OF SHIGA-LIKE TOXIN II B SUBUNITS" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 63, Nr. 1, 1. Januar 1995 (1995-01-01), Seiten 301-308, XP000198707 ISSN: 0019-9567 ---	
A	FRANKE, S. ET AL.: "Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs." VETERINARY MICROBIOLOGY, Bd. 43, 1995, Seiten 41-52, XP002120989 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 42, Absatz 3 Seite 46, Absatz 3.3 Seite 49, Absatz 5 Seite 50, Absatz 2 - Absatz 3 ---	

	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GUNZER, F. ET AL.: "Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 31, Nr. 10, Oktober 1993 (1993-10), Seiten 2604-10, XP002120990 Zusammenfassung Seite 2609, Zeile 11 - Zeile 12 -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PO 00/05127

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9811229	A	19-03-1998	AU 4184597 A EP 0929679 A	02-04-1998 21-07-1999
WO 9630043	A	03-10-1996	AU 5431196 A CA 2218601 A EP 0817647 A JP 11506424 T US 6080400 A	16-10-1996 03-10-1996 14-01-1998 08-06-1999 27-06-2000
WO 9731117	A	28-08-1997	US 5800981 A AU 1876397 A CA 2246802 A EP 0882132 A	01-09-1998 10-09-1997 28-08-1997 09-12-1998
WO 9612802	A	02-05-1996	US 5736139 A US 5919665 A US 5601823 A US 5196193 A AU 709586 B AU 3968395 A AU 4876399 A BR 9509903 A CA 2203504 A CN 1176658 A CZ 9701250 A EP 0796326 A FI 971732 A HU 78048 A NO 971868 A NZ 295998 A PL 320214 A ZA 9508990 A AU 688763 B AU 6653894 A CA 2150935 A EP 0671902 A WO 9413264 A US 5762934 A US 5814477 A US 5466672 A US 5599539 A US 5719267 A AT 170079 T AU 638786 B AU 6895191 A DE 69032599 D EP 0498854 A WO 9106306 A US 5443976 A US 5904922 A US 5340923 A	07-04-1998 06-07-1999 11-02-1997 23-03-1993 02-09-1999 15-05-1996 25-11-1999 25-11-1997 02-05-1996 18-03-1998 18-03-1998 24-09-1997 23-06-1997 28-07-1999 24-06-1997 28-10-1999 15-09-1997 15-05-1996 19-03-1998 04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995 23-06-1994 09-06-1998 29-09-1998 14-11-1995 04-02-1997 17-02-1998 15-09-1998 08-07-1993 31-05-1991 01-10-1998 19-08-1992 16-05-1991 22-08-1995 18-05-1999 23-08-1994
FR 2766193	A	22-01-1999	AU 8812498 A EP 1017715 A WO 9903881 A	10-02-1999 12-07-2000 28-01-1999
DE 4219696	A	19-08-1993	AT 152483 T AU 3628293 A	15-05-1997 03-09-1993

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Antragsdatum auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 43 222-22

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Rekombinantes Fusionsprotein, dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung und Verfahren zu dessen Herstellung

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4
D-27472 Cuxhaven/DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

04721/747-0

Telefaxnr.:

04721/747 161

Fernschreiber.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BALJER, Georg, Prof. Dr. med vet.
Ludwig-Rinn-Strasse 15
D-35452 Heuchelheim/DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER: ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SIEMONS, Norbert, Dr.
Neuer Wall 41
D-20354 Hamburg/DE

Telefonnr.:

040/36 67 55

Telefaxnr.:

040/36 40 39

Fernschreiber.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und stattdessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

FRANKE, Sylvia, Dr. med. vet.
Elly-Heuss-Knapp-Weg 18
D-35396 Gießen/DE

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen: wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DM Dominica | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IN Indien | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz 1 auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht genutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigegeben werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:

- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
- (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
- (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
- (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
- (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat" oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
- (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
- (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO-Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder ein Mitglied der Welthandelsorganisation (WTO) (das nicht Mitgliedstaat der Verbandsübereinkunft ist) an, und für den/das die frühere Anmeldung erfolgte.

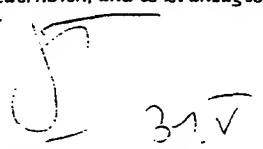
2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.

3. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

Fortsetzung von Feld Nr. IV

HAUCK, Hans
GRAALFS, Edo
WEHNERT, Werner
DÖRING, Wolfgang
SIEMONS, Norbert
Postfach 30 24 30

D-20308 Hamburg/DE

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 4. Juni 1999 04/06/1999	99 110 759.0		EPA München	
Zeile (2)				
Zeile (3)				
<input checked="" type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) <u>1</u> bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist/sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist) * Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.				
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE				
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche: Bezugnahme auf diese frühere Recherche/falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):		
ISA /		Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE: EINREICHUNGSSPRACHE				
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:		
Antrag :	5	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung		
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) :	17	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht		
Ansprüche :	5	3. <input checked="" type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 36266		
Zusammenfassung :	1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift		
Zeichnungen :		5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:		
Sequenzprotokollteil der Beschreibung :		6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:		
Blattzahl insgesamt :	28	7. <input checked="" type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material		
		8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form		
		9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch		
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS				
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.				
 SIEMONS, Norbert Patentanwalt				

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen eingegangen: <input type="checkbox"/>
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	nicht eingegangen: <input type="checkbox"/>
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts

43 222-22

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Anmelder

LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG, u.a.

BERECHNUNG DER VORGESCHRIBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR EUR 102,00 T

2. RESEARCHENGEBÜHR EUR 945,00 S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von _____
 (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
 ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 28 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter EUR 409,00 b1

_____ x _____ = _____ b2

Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr
über 30Addieren Sie die in Feld b1 und b2 eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein EUR 409,00 B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält 9 Bestimmungen.

8 x EUR 88,00 = EUR 704,00 D

Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühren

Bestimmungsgebühren (maximal 3)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein EUR 1.113,00 I

(Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um 75%.
 Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzutragende
 Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge)

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG (ggf.) - P

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein EUR 2.160,00

INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

☐ Abbuchungsauftrag (siehe unten) ☐ Bankwechsel ☐ Kupons
☐ Scheck ☐ Barzahlung ☒ Sonstige (einzeln angeben):
☐ Postanweisung ☐ Gebührenmarken nach Erhalt des
Aktenzeichens

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

Das Anmeldeamt/ _____ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.☐ (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften des Anmeldeamts über laufende Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

- 1 -

Rekombinantes Fusionsprotein, dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammen-
setzung und Verfahren zu dessen Herstellung

Die Erfindung bezieht sich auf ein rekombinantes Fusionsprotein, auf eine (Impf-)Stoffzusammensetzung mit dem rekombinanten Fusionsprotein und auf ein Verfahren zur Herstellung des rekombinanten Fusionsproteins.

Die Ödemkrankheit der Schweine wird durch Shiga-Toxin bildende Escherichia Coli (STEC) hervorgerufen. Hauptvirulenzfaktor dieser Erreger und ausschließlich verantwortlich für die klinischen Symptome ist das Shiga Toxin 2e (Stx2e) (MacLeod et al. 1991) Da die Erkrankung in vielen Fällen einen perakuten Verlauf zeigt und Therapieversuche meist zu spät begonnen werden bzw. nicht den gewünschten Erfolg zeigen, wäre die Entwicklung einer wirksamen Prophylaxe wünschenswert. Die Gewinnung und Aufreinigung des Stx2e ist problematisch.

Die B-Untereinheit des Stx2e kommt aus verschiedenen Gründen als Vakzinekandidat in Frage. Sie wird von Seren rekonvaleszenter Ferkel erkannt, d.h. sie besitzt antigene Determinanten. Des weiteren induziert die B-Untereinheit des Toxins nach parenteraler Applikation die Bildung toxin-neutralisierender Antikörper (Acheson et al. 1996; Boyd et al. 1991). Mit Hilfe gentechnischer Methoden ist es gelungen, ein rekombinantes Fusionsprotein herzustellen, das aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Glutathion-S-Transferase von Shistosoma Japonicum besteht (Franke et al. 1995). Bei der Ödemkrankheit der Absetzferkel wurde bereits sowohl die Erregerausscheidung als auch die immunologische Reaktion auf die STEC-Infektion über einen längeren Zeitraum untersucht. Das zum Nachweis von Stx2e-Antikörpern eingesetzte rekombinante

Fusionsprotein aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Glutathion-S-Transferase eignete sich sehr gut zum indirekten Nachweis der STEC-Infektion und wurde bislang als potentiell Impfantigen zur Prophylaxe der Ödemkrankheit angesehen (Wieler L. H., Franke Sylvia, Rose M. und Karch H. Charakterisierung der Immunantwort bei der Ödemkrankheit des Schweines mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-II_e. Vortrag gehalten auf dem 21. DVG Kongress in Bad Nauheim (März 1995)).

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein insbesondere für Impfzwecke geeignetes rekombinantes Fusionsprotein, ein dieses codierendes Plasmid, eine das Fusionsprotein enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine, und ein Verfahren zur Herstellung des rekombinanten Fusionsproteins zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird durch ein rekombinantes Fusionsprotein mit den Merkmalen des Anspruchs 1, eine (Impf-)Stoffzusammensetzung mit den Merkmalen des Anspruchs 5, einen E.coli-Stamm gemäß Plasmid gemäß Anspruch 18 und durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 20 gelöst. Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß werden ein rekombinantes Fusionsprotein und eine dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung zur Verfügung gestellt, die im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine, verschiedenen Verwendungen zugeführt werden können. So kommen insbesondere als Verwendungen in Betracht:

- der Nachweis von Antikörpern gegen Stx2e,
- die Diagnose der Ödemkrankheit,
- die Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen das Toxin des Ödemkrankheitserregers, insbesondere als Basis für die Kontrolle der Ausbeute bei der Gewinnung des rekombinanten Fusionsproteins oder als Basis für die Gewinnung des Holotoxins durch immunaffinitätschromatografische Reinigung,
- die Immunisierung gegen die Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine.

Das rekombinante Fusionsprotein ist ein subgenisches Stx2e-Fragment des Shiga-Toxins 2e in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragments oder eines Bruchteils des Fragments entspricht. Der terminale Tag ist eine markierte Endgruppe in der Aminosäurenfolge des Proteins. Vorzugsweise ist das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e. Die Größe des terminalen Tags beträgt vorzugsweise maximal 5 kDa, weiterhin vorzugsweise maximal 1 kDa. Weiterhin vorzugsweise handelt es sich dabei um einen aminoterminalen His-Tag. Das His-Tag umfaßt sechs Histidine. Seine Größe beträgt ca. 0,66 kDa.

Das rekombinante Fusionsprotein weist wesentliche antigene Domänen des nativen Proteins auf, die seine Eignung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit begründen. Dies ist zwar theoretisch auch schon bei den bislang bekannten rekombinanten Fusionsproteinen aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Gluthathion-S-Transferase der Fall. Hier stellt sich allerdings das Problem, daß nach Einschätzung der

Anmelderin mit störenden immunologischen Reaktionen gerechnet werden muß, die einem Einsatz der gattungsgemäßen Fusionsproteine zu z.B. therapeutischen Zwecken entgegenstehen. Ein wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen Fusionsproteine besteht demgegenüber darin, daß hier aufgrund des speziell ausgewählten Tags nicht mit störenden Immunantworten zu rechnen ist und damit erstmals Fusionsproteine zur Verfügung stehen, die z.B. in Impfstoffen einsetzbar sind. Wie bei gattungsgemäßen Fusionsproteinen, so begünstigt auch das erfindungsgemäß verwendete Tag die Gewinnung des rekombinanten Fusionsproteins, insbesondere dessen Reinigung, beispielsweise durch ein affinitätschromatografisches Verfahren.

Oligomere aus vernetzten His-Stx2eB-Monomeren können besonders wirksame Fusionsproteine bilden.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung umfaßt die (Impf-)Stoffzusammensetzung außer den rekombinanten Fusionsproteinen mindestens ein zusätzliches Antigen. Bei einer Impfstoffzusammensetzung handelt es sich dann um eine Formulierung einer immunogenen Menge des rekombinanten Fusionsproteins und einer immunogenen Mengen mindestens eines zusätzlichen Antigens. Mit diesem Kombinationsimpfstoff kann eine gleichzeitige Impfung gegen die Ödemkrankheit der Schweine und gegen mindestens eine weitere Krankheit erfolgen.

Insbesondere kann die (Impf-)Stoffzusammensetzung außer den rekombinanten Fusionsproteinen mindestens ein zusätzliches Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Pasteurella multocida-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem Bordetella

bronchiseptica-Bacterin, einem Erysipelothrix rhusiopathiae-Antigen, einem oder mehreren löslichen zellfreien Toxoiden vom Pasteurella multocida Typ D und/oder Escherichia coli und/oder Clostridium perfringens, inaktivierten ganzen Zellen von Pasteurella multocida Typ A oder D, Kulturen von Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Streptokokkus suis, Mycoplasma hyopneumoniae sowie Porcine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus, Influenzavirus, Pseudorabiesvirus und Porcine Circovirus I und II ist.

Vorstehende Antigene sind für die Verursachung folgender Krankheiten bekannt:

- Pasteurella multocida und Bordetella bronchiseptica verursachen die progressive atrophische Rhinitis der Schweine, auch „Schnüffelkrankheit“ genannt; pathogenetisch spielen vor allem die Pasteurella multocida Toxine eine bedeutende Rolle (in kommerziellen Impfstoffen ist der Toxoidgehalt wichtig)
- Pasteurella multocida A und D kommt vor bei Atemwegserkrankungen des Schweins (Lungenentzündung), Pasteurella multocida D verursacht auch die Schnüffelkrankheit
- Erysipelothrix rhusiopathiae – Rotlauferkrankung
- Escherichia coli – Durchfallerkrankungen (Sonderform ist die Ödemkrankheit der Schweine) (Toxine sind entscheidend)

- *Clostridium perfringens*: nekrotisierende Enteritis der Saugferkel (Toxine sind entscheidend)
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*: hämorrhagisch-nekrotisierende Pleuropneumonie
- *Haemophilus parasuis*: Glässersche Krankheit (Fibrinöse Serosen- und Gelenkentzündung)
- *Streptokokkus suis*: Streptokokken Septikämie
- *Mycoplasma hyopneumoniae*: Enzootische Pneumonie, auch als „Ferkelgrippe“ bezeichnet
- Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: bei Ferkeln Atemwegserkrankung (Lungenentzündung), bei Sauen Fruchtbarkeitserkrankungen
- Influenzavirus: Atemwegserkrankung
- Pseudorabiesvirus: Aujeszky'sche Krankheit des Schweines (Pseudowut)
- Porcine Circovirus I und II: Post-weaning multisystemic wasting syndrome.

Vorzugsweise ist das mindestens eine zusätzliche Antigen so ausgewählt, daß es sich auf eine Krankheit bezieht, die das Schwein typischerweise etwa in dem gleichen Alter wie die Ödemkrankheit befällt. Das ist bei den oben

angeführten Antigenen weitgehend der Fall. Die Impfstoffzusammensetzung ermöglicht dann eine besonders wirksame Kombinationsimpfung.

In der Impfstoffzusammensetzung ist vorzugsweise das rekombinante Fusionsprotein und/oder das mindestens eine zusätzliche Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen enthalten.

Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf Impfstoffzusammensetzungen, deren Zusammensetzungen und/oder Mengen so gewählt sind, daß eine Immunisierung des jeweiligen Tieres gegen die mindestens eine Krankheit durch sequentielle und/oder gleichzeitige Impfung mit den Impfstoffzusammensetzungen erreichbar ist.

Von besonderer Bedeutung für die (Impf-)Stoffzusammensetzung ist die Auswahl des Adjuvans. Beispielsweise kann eine W/O/W- (z. B. ISA 206), eine W/O-Emulsion (z. B. iFA-inkomplettes Freund'sches Adjuvans, eine wäßrige Suspension (z. B. Aluminiumhydroxid) oder eine O/W-Emulsion zum Einsatz kommen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines subgenischen Fragments des Shiga Toxin 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag wird in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E. coli-Stamm transformiert, das entstandene Expressionssystem induziert und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt.

Das Gen der B-Untereinheit von Shiga Toxin 2e (Stx2eB) wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Mit den so entstandenen rekombinanten Plasmiden wurden verschiedene E-coli-K12-Laborstämme transformiert. Alle Transformanten wurden in Expressionsstudien unter variierenden Bedingungen (Temperatur, Induktionslevel, Induktionsdauer) auf Bildung der rekombinanten B-Untereinheit getestet. Der Transformant bzw. Klon mit der höchsten Ausbeute an rekombinantem Protein im Verhältnis zum Gesamtzellproteingehalt wurde ermittelt. Für das von diesem Stamm gebildete Fusionsprotein, bestehend aus der reifen B-Untereinheit mit einem N-terminalen His-Tag (His-Stx2eB), wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt und im Labormaßstab getestet. Für die Umsetzung des Reinigungsverfahrens im Großmaßstab ist FPLC unter Verwendung geeigneter Puffersysteme vorgesehen.

Beispiel

Herstellung der rekombinanten B-Untereinheit des Stx2e

Für die Herstellung der rekombinanten B-Untereinheit wird der Stamm E. coli Cux-Stx2eB, DSM-Nr. 12721 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig), verwendet. Dieser E. coli-Laborstamm enthält das Plasmid pHIT-24, welches die B-Untereinheit des Stx2e kloniert.

Von diesem Stamm wurde ein seed lot System angelegt und bei -78°C, abgefüllt in 2 ml Kryo-Vials, gelagert.

Für die Produktion der rekombinanten B-Untereinheit wird 1 Ampulle working seed (2 ml) für die Anzucht einer Vorkultur 1 aufgetaut.

Die Vorkultur 1 wird unter folgenden Bedingungen hergestellt :

Medium : 150 ml sterile Standard-I-Nährbouillon + 0,01% Ampicillin in einem Erlenmeyerkolben 300 ml

Bebrütung : 15 Stunden bei 37 °C, Standkultur

Für den Hauptansatz wird ein Fermenter "BIOSTAT B" mit einem 5-L-Kulturgefaß benutzt. Dieses Gefaß ist mit 4 L Standard-I-Nährbouillon + 0,01% Ampicillin gefüllt und wurde als Einheit für 25 Minuten bei 121 °C autoklaviert..

In dieses Medium wird die Vorkultur 1 gegeben und unter folgenden Bedingungen für 6

Stunden kultiviert : Temperatur : 37 °C

pH = 7,0-7,1

Rührgeschwindigkeit : 100-150 rpm

Luftzufuhr : 2 L / min

Die Regulierung des pH wird durch das automatische Zugeben einer sterilen 10 % NaOH-Lösung gewährleistet.

Die Induktion wurde nach 6 Stunden Kultivierung durch Zugabe von 0,25 mM IPTG-Lösung * und einem pH-Sprung von 7,1 auf 7,5 eingeleitet. Die Induktionsdauer betrug ca. 3,5 Stunden.

Anschließend wurde die Kultur in ein 10-L-Erntebehälter gepumpt und in einer Zentrifuge mit 2500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 ml eines 8 M Harnstoffpuffers aufgenommen und für ca. 15 Stunden in einem Kühlraum (4-8 °C) verbracht. Das resuspendierte Pellet wurde danach mit Ultraschall behandelt (4 x 15 Minuten, 190 Hertz, 0,3 Sekunden pulsierend) und anschließend mit 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und diente der weiteren Bearbeitung; das bei diesem Schritt erhaltene Pellet wurde verworfen.

Im Anschluß daran wurde die Lösung mittels einer Ultrafiltration ("Pellicon XL ") von 200 ml auf 80 ml eingeeengt.

Die so erhaltene 80 ml-Proteinlösung wurde dann mittels einer Affinitäts-Chromatographie (FPLC "Äktaexplorer") weiter bearbeitet.

Das das rekombinante Zielprotein enthaltene Material wurde fraktioniert, jeweils 3 ml, aufgetragen und über eine mit Metall-Chelat-Matrix (Ni-NTA, Qiagen) beladene Säule (Volumen : 8 ml) gegeben.

* IPTG: Isopropylbeta-D-Thiogalaktopyranosid

Diese Matrix bindet spezifisch das His-Tag des rekombinanten Proteins. Das Targetprotein wird vom Metall festgehalten und unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 0,1 M Na_2HPO_4 , 10 mM Tris/HCL, pH 8) gewaschen. Nach der Entfernung der kontaminierenden Proteine wird das rekombinante Protein durch einen pH-Sprung (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 10 mM Tris/HCL, pH 3) von der Affinitätsmatrix desorbiert und am Säulenausgang aufgefangen.

Das gereinigte Protein wird mittels Cross-Flow-Filtration (Porengröße 5 kDa) konzentriert. Nach Prüfung der Reinheit und Ausbeute (über SDS-Gelelektrophorese, Westernblotting, Elisa, Proteinbestimmung) erfolgt der Austausch des Harnstoff-Puffers gegen eine physiologische Pufferlösung (PBS, pH 7,2). Der Austausch erfolgt mittels Cross-Flow-Filtration (Porengröße 5 kDa). Das rekombinante Protein lag in einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ vor.

Beschreibung des rekombinanten Fusionproteins

Das Targetprotein wird durch das Genfragment Stx2eB codiert. Die Größe dieses subgenischen Fragments der B-Untereinheit von Stx2e beträgt 228 bp.

Folgende eigenschaften des rekombinanten Proteins wurden geprüft :

1. Molekulargewichtsgröße

Das Targetprotein hat ein in der SDS-Gelelektrophorese ermitteltes Molekulargewicht von ca. 7,5 kDa.

2. Kontrolle des rekombinanten Proteins im Immunoblot mit Seren erkrankter Ferkel

Das gereinigte Antigen wurde im Immunoblot mit Seren von an Ödemkrankheit erkrankten Ferkeln untersucht. Bei den Tieren handelte es sich um Ferkel aus Schweinezuchtbetrieben, in denen klinisch manifeste Erkrankungen mit Stx2e-E.coli-Stämmen auftraten.

Über 90 % dieser Seren reagierten positiv mit dem rekombinanten Protein. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden die Untersuchungen mit der B-Untereinheit, an die Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* gekoppelt, verifiziert.

3. Kontrolle des rekombinanten Proteins mit monoklonalen Antikörpern gegen Stx2eB

Um festzustellen, ob die Konformation der rekombinanten B-Untereinheit dem Wildtyp-Protein ähnelt, wurde das rekombinante Stx2eB im Dot-Blot-Verfahren untersucht.

Dazu wurde der monoklonale Antikörper BC5BB12 eingesetzt, der spezifisch die B-Untereinheit von Stx2 erkennt und auch mit der B-Untereinheit von Stx2e kreuzreagiert.

Als Positivkontrolle wurde das Stx2e-Holotoxin mitgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Rohtoxinpreparation von Stx1.

Der monoklonale Antikörper BC5BB12 reagierte sowohl mit dem Stx2e-Holotoxin, als auch mit dem rekombinanten Stx2eB-Protein, jedoch nicht mit dem Stx1.

4. Prüfung des rekombinanten Proteins auf Zytotoxizität im Verozelltest

Die Zytotoxizität des rekombinanten Proteins wurde im Zytotoxizitätstest an Verozellen, Helazellen sowie MDBK-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Konzentrationen von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$ an rekombinanten Stx2eB eingesetzt. Selbst in den niedrigsten Verdünnungsstufen konnte in keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikanter Unter-

schied zur Negativkontrolle (Puffer ohne rekombinantes Protein) festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, daß das rekombinante Stx2eB per se nicht zytotoxisch ist.

5. Nachweis der Immunogenität des rekombinanten Stx2eB im Kaninchenversuch.
Zwei weibliche Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" im Alter von ca. 12 Monaten wurden mit dem rekombinanten Stx2eB immunisiert. Bei der 1. Vakzination wurden 100 µg Antigen unter Zugabe von inkompletten Freundschens Adjuvans (iFA) subcutan verabreicht. Die Boosterung erfolgte sechs Wochen später mit 50 µg rekombinantem Stx2eB subcutan, ebenfalls mit iFA. Die vor und nach der Vakzinierung gewonnenen Seren wurden im Immunoblot untersucht.
In beiden Kaninchen wurde eine spezifische Serumkonversion nachgewiesen.

Beschreibung der Herstellung von Vakzineformulierungen (Beispiele)

1. Herstellung einer W/O/W-Vakzineformulierung
Unter sterilen Bedingungen wird das Antigen als wäßrige Phase (Temperatur 22°C) während des Rührens (U.T. < 2000 Upm) kontinuierlich in das Adjuvans (z. B. Montanide ISA 206) gegeben. Anschließend wird die Emulsion 10 Minuten bei ca. 2000 Upm homogenisiert.
Nach 24 h Lagerungszeit bei 8°C wird die Vakzineformulierung erneut homogenisiert. Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.
2. Herstellung einer W/O-Vakzineformulierung
Unter sterilen Bedingungen wird das Antigen als wäßrige Phase (Temperatur 22°C) während des Rührens (U.T. < 2000 Upm) kontinuierlich in das Adjuvans (z. B. inkomplettes Freundsches Adjuvans) gegeben und emulgiert.
Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.
3. Herstellung einer wäßrigen Suspension
Unter sterilen Bedingungen wird das wäßrige Antigen während des Rührens (z.B. Magnetrührer) kontinuierlich in das wäßrige Adjuvans (z. B. Aluminiumhydroxide) gegeben und gerührt.
Die Vakzine wird geprüft anhand der Parameter pH und Tonizität.
4. Herstellung einer O/W-Suspension
Unter sterilen Bedingungen wird das wäßrige Antigen kontinuierlich in das Adjuvans gegeben und emulgiert.
Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.

Nach der Herstellung der Vakzineformulierungen wurde diese bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank bei Temperaturen von +4°C - +8°C gelagert.

Beispiel des Nachweises der immunogenen Wirkung des rekombinanten Stx2eB im Zieltier Schwein unter Verwendung verschiedener Vakzineformulierungen

Ziel des Versuches

Untersuchung der Fragestellung : Kann das gentechnisch hergestellte rekombinante Stx2eB-Protein (unter Verwendung verschiedener Adjuvantien) nach zweimaliger i.m. Applikation im Absatzferkel eine Immunantwort induzieren ?

Für diesen Versuch wurden 8 Absetzer im Alter von 6 Wochen eingesetzt.
6 Tiere wurden mit Vakzinepräparationen behandelt, 2 Tiere erhielten ein Placebo verabreicht.
Die Impfstoffapplikationen erfolgten zweimal im Abstand von 3 Wochen.
Von jedem Tier wurden folgende Blutproben entnommen .

1. Vor der 1. Immunisierung
2. 14 Tage nach der 1. Immunisierung
3. Unmittelbar vor der 2. Immunisierung (21 Tage nach der 1. Immunisierung)
4. 14 Tage nach der 2. Immunisierung
5. 21 Tage nach der 2. Immunisierung

Die Seren wurden im Elisa auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern untersucht, die gegen das rekombinante Stx2eB gerichtet sind.

Außerdem wurden die Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzine bewertet.

Allgemeine Versuchsdaten

Tiere

Tierart : Schwein

Tierkategorie : Absetzer

Alter : 6 Wochen (bei 1. Impfung)

Geschlecht : gemischt

Immunstatus der Tiere bei Versuchsbeginn : Stx2eB-Antikörper negativ

Halteform : Gruppenhaltung

Fütterungsschema : ad libitum

Wasserversorgung : aus Wasserleitung ad libitum

Einsatz von Futterzusatzstoffen : kein Einsatz von Futterzusatzstoffen

Impfstoffverabreichungsparameter

Applikationsweise : Injektion

Applikationsweg : i. m.

Zeitraum zwischen den zwei Impfstoffapplikationen : 3 Wochen

Vorbehandlung des verabreichten Mittels : keine

Vorbehandlung der Versuchstiere : keine

Anzahl der Impflinge : 8

Anzahl der Kontrolltiere : 2

Studiendesign : randomisiert, blind

Impfstoffdosis, Tierkennzeichnung, Vakzineinsatz

Der konkrete Versuchsplan ist in Tabelle 1 dargestellt.

Adjuvansschlüssel

Adjuvans A - ISA 206

Adjuvans B - iFA

Adjuvans C - Montanide

Versuchsverlauf

Auftreten von Nebenwirkungen : nach 1. Impfung - leichte Beeinflussung des Allgemeinzustandes und der Futteraufnahme,
Tier 7 und 8 hatten eine leichte Körpertemperaturerhöhung + leichten Durchfall

nach 2. Impfung - außer Körpertemperaturerhöhung beim Tier 8 keine weiteren Nebenwirkungen

Anzahl der Tiere, die während des Versuches ausschieden :

Asetzer Nr. 2, Grund : E.coli-verursachte Magen - und Darmentzündung

Auftreten von Krankheiten, die nicht mit der Vakzination zusammenhängen :

außer der Erkrankung beim Absetzer Nr. 2 keine

Behandlung mit anderen Mitteln : keine

Ergebnisse

Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzineformulierungen :

Die Vakzineformulierungen können insgesamt als verträglich und sicher eingeschätzt werden, obwohl es nach der 1. Immunisierung zu einer leichten Störung des Allgemeinbefindens, zu einer kurzzeitigen Beeinträchtigung der Futteraufnahme und zu einer Körpertemperaturerhöhung - verbunden mit leichten Durchfall - bei den Tieren 7 und 8 kam. Die 2. Impfung wurde ohne das Auftreten von klinischen Symptomen vertragen. Nur das Tier Nr. 8 reagierte auf die erneute Imstoffapplikation mit einer Erhöhung der Körpertemperatur.

Lokale Gewebsreaktionen - palpatorisch bemerkbares leichtes Ödem - traten nur nach der 1. Impfung an der Injektionsstelle der Tiere 5 und 6 auf.

Nach der Schlachtung der Ferkel konnten an den Injektionsstellen, mit Ausnahme der Tiere 1 und 3, makroskopisch erkennbare Entzündungen um den Strichkanal, die mit nekrotischem Material bei allen Tieren ausgefüllt war, festgestellt werden. Bei der histologischen Untersuchung der Ferkel 1 und 3 konnte nur eine leichte Bindegewebsproliferation (Angioblasten mit Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten) festgestellt werden, während der mit nekrotischem Material ausgefüllte Stichkanal bei allen anderen Ferkeln mit einer bindegewebigen Kapsel umgeben war. In der bindegewebigen Kapsel konnte eine Entzündung mit Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten beobachtet werden.

Wirksamkeit der Vakzineformulierungen

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Stx2eB nach i. m. Applikation in 6 Wochen alten Absetzern vom Immunsystem der Tiere erkannt wird und eine Immunantwort - Produktion von spezifischen Immunglobulinen - induziert.

Der Nachweis dieser Antikörper wurde mittels Elisa und Immunoblot durchgeführt.

Die Stärke der Immunantwort scheint von der Wahl der verwendeten Vakzineformulierung abhängig zu sein.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten die besten Ergebnisse mit einer W/O-Emulsion (z. B. unter Verwendung von iFA) erzielt werden. Im einzelnen sind die Ergebnisse in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Versuchsmuster, Gewicht der Tiere und die verabreichte Menge der Impfstoffe

Nr. der Tiere	Bezeichnung	Zusammen- setzung	Gehalt wirk- samer Bestand- teile	Anzahl der Schweine/VM	Körpergewicht in kg	Verabreichte Impfstoffmenge in ml
1	Stx2eB Vaccine G27V27	PBS Adjuvans A	-	2	12,5	2,2
3	01 Placebo	Thiomersal			12,5	2,2
2	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans A	0,167 mg/ml	2	15	2,7
4	G97V27-02	Thiomersal			13	2,3
5	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans B	0,167 mg/ml	2	16	2,9
6	G97V27-03	Thiomersal			12,5	2,2
7	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans C	0,250 mg/ml	2	14	2,5
8	G97V27-04	Thiomersal			14	2,5

Tabelle 2

Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf Anti-StxB2e der Schweineserumproben aus dem Immunisierungsversuch

Impfstoff	Ergebnisse Immunoblot / ELISA (ELISA-Einheiten)						3.3.1998						10.3.1998					
	27.1.1998			10.2.1998			17.2.1998			Nr.			Nr.			Nr.		
	Nr.	IB	ELISA	Nr.	IB	ELISA	Nr.	IB	ELISA	Nr.	IB	ELISA	Nr.	IB	ELISA	Nr.	IB	ELISA
Placebo	1	-	-(236)*	9	-	-(357,6)	17	-	-(359,6)	25	-	-(258,3)	33	-	-(398)			
Adjuvans A	3	-	+(403)	11	-	-(356,3)	19	-	-(328)	27	-	?(1130)	35	-	-(380,3)			
rStx2eB	2	-	-(231)	10	/	/	18	/	/	/	/	/	/	/	/			
Adjuvans A	4	-	-(221)	12	-	-(350,3)	20	-	+(436)	28	-	+(432,3)	36	-	-(345)			
rStx2eB	5	-	(+) (357)	13	++	+++ (1133,3)	21	++	+++ (1849,6)	29	++	+++ (2767)	37	++	+++ (2908)			
Adjuvans B	6	-	-(281,3)	14	(+)	+(432,6)	22	+	++ (691,3)	30	++	+++ (819,3)	38	+	+++ (1095,3)			
rStx2eB	7	-	-(233,6)	15	-	+(474,6)	23	(+)	+(539,3)	31	+	+(473,6)	39	-	+(411)			
Adjuvans C	8	-	-(241)	16	-	+(425)	24	(+)	+(437)	32	-	+(411,6)	40	-	-(389,3)			

+ Positivkontrolle +++ (808); Negativkontrolle -- (187,3)

Hinterlegter Mikroorganismus:

Der E.Coli-Stamm Cux-Stx2eB wurde hinterlegt unter der ursprünglichen
Bezeichnung: Cux-SLT-IIe-B bei der

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GmbH,

Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Ihm wurde von der Hinterlegungsstelle die Eingangsnummer

DSM 12721

zugeteilt.

Ansprüche

1. Rekombinantes Fusionsprotein mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.
2. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1, bei der das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
3. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1 kDa.
4. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit einem aminoterminalen His-Tag.
5. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
6. (Impf-)Stoffzusammensetzung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit der Tiere, insbesondere Säugetiere, vor allem Schweine, mit einem subgenischen Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.

7. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 6, bei der das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (STx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
8. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 6 oder 7 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1kDa.
9. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit einem aminoterminalen His-Tag.
10. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 9 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
11. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, die ein zusätzliches Antigen oder mehrere zusätzliche Antigene umfaßt.
12. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das eine oder mehrere zusätzliche Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Pasteurella multocida-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem Bordetella bronchiseptica-Bacterin, einem Erysipelothrix rhusiopathiae-Antigen, einem oder mehreren löslich zellfreien Toxoiden von Pasteurella multocida Typ D und/oder Escherichia coli und/oder Clostridium perfringens, inaktivierten ganzen Zellen von Pasteurella multocida Typ A oder D, Kulturen von Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Streptokokkus suis, Mycoplasma hyopneumoniae sowie Procine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus, Influenzavirus, Pseudorabiesvirus und Porcine Circovirus I und II.

13. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, die das subgenische Stx-IIe-Fragment des Shigatoxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag und/oder das mindestens eine zusätzliche Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen umfaßt.
14. Impfstoffzusammensetzungen nach einem der Ansprüche 6 bis 13 in Zusammensetzungen und Mengen, so daß sie bei sequentieller und/oder gleichzeitiger Impfung von Schweinen diese gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen immunisieren.
15. (Impf-)Stoffzusammensetzung mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, insbesondere nach einem der Ansprüche 6 bis 12, in einer W/O/W-Emulsion, in einer O/W-Emulsion, in einer W/O-Emulsion oder in einer wäßrigen Suspension.
16. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 15 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (iFA).
17. Plasmid enthaltend DNA, die ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert.
18. E.Coli-Stamm, transformiert mit einem Plasmid gemäß Anspruch 17.

19. E.coli-Stamm gemäß Anspruch 18, hinterlegt bei der DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 12721.
20. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines subgenischen Fragmentes des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, bei dem in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert wird, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E.coli-Stamm transformiert wird, das entstandene Expressionssystem induziert wird und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, bei dem das subgenische Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, bei dem das terminale Tag eine Größe von maximal 1kDa hat.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, bei dem das terminale Tag ein aminoterminales His-Tag ist.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, bei dem die Expressionskultur einer Lysepufferbehandlung unterzogen wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 24, bei dem die Expressionskultur einer Behandlung in einer French Press oder mittels Ultraschall unterzogen wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 25, bei dem die Expressionskultur nach Behandlung mit der French Press oder mittels Ultraschall und/oder mit Lysepuffer einer affinitätschromatografischen Reinigung zugeführt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die Reinigung mittels einer FPLC durchgeführt wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 27, bei dem das gereinigte Fusionsprotein vernetzt wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 28, bei dem durch Fusion von Milzzellen von unter Verwendung des rekombinanten Fusionsproteins immunisierten Mäusen mit Myelomzellen Hybridoma-Klone für die Herstellung von Anti-Stx2eB-Immunglobulinen erzeugt werden.
30. Verfahren nach Anspruch 29, bei dem die mittels der Hybridoma-Klone produzierten Antikörper zur in-process-Kontrolle für die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine verwendet werden.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, bei dem die von den Hybridoma-Klonen produzierten Antikörper für ein immunaffinitätschromatografisches Reinigungsverfahren für das Stx2e-Holotoxin verwendet werden.

Zusammenfassung

Rekombinantes Fusionsprotein, dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung und Verfahren zu dessen Herstellung

Rekombinantes Fusionsprotein mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.

Applicant's or agent's file reference 43 222-22	International application No.
---	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>17</u> , line <u>2 to 9</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig/DE	
Date of deposit 1999-03-09	Accession Number DSM 12721
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Der wissenschaftliche Name, die Charakteristika der Mikroorganismen, die Empfangsbescheinigung und die Lebensfähigkeitsbescheinigung der Hinterlegungsstelle ergeben sich aus folgenden Unterlagen: Erklärung bei Ersthinterlegung der Anmelderin vom 5./8. März 1999 nebst Anlagen (Anlage 1); Empfangsbestätigung bei Ersthinterlegung der DSMZ vom 11. März 1999 (Anlage 2); Lebensfähigkeitsbescheinigung der DSMZ vom 11. März 1999 (Anlage 3)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	
Authorized officer	

For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
Authorized officer	

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

Anlage 1

ERKLÄRUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG
(REGEL 6.1)

An
DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Von der Hinterlegungsstelle auszufüllen:

DSMZ-Aufnahmenummer:

Eingangsdatum der Kultur:

BAKTERIEN/PILZE¹

DER UNTERZEICHNETE HINTERLEGT DEN NACHSTEHEND BEZEICHNETEN MIKROORGANISMUS AUFGRUND DES BUDAPESTER VERTRAGES UND VERPFLICHTET SICH, DIE HINTERLEGUNG WÄHREND DER IN REGEL 9.1 GENANNTEN DAUER NICHT ZURÜCKZUNEHMEN²

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Bezugszeichen ³ : <i>Cux-SLT-\bar{U}_c-B</i>	Die zu hinterlegende Kultur ist:
	<input checked="" type="checkbox"/> eine Reinkultur
Taxonomische Bezeichnung ⁴ : <i>E. coli-BL21 (DE3) / SLT-\bar{U}_c-B</i>	<input type="checkbox"/> eine Mischkultur
II. ZÜCHTUNGSBEDINGUNGEN ()⁵	
Medium:	pH vor der Sterilisation
	Sterilisation min bei °C
	pH nach Sterilisation:
	Verhalten gegenüber Sauerstoff:
	<input type="checkbox"/> aerob
	<input type="checkbox"/> mikroaerophil
	<input type="checkbox"/> obligat anaerob
	Besondere Ansprüche an die Gasatmosphäre:
	Bebrütungstemperatur: °C
	Bebrütungsdauer:
	Aufbewahrung bei: °C

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Merkblatt 'Sichere Biotechnologie', Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien bzw. Pilze (B 006, B 007) der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie bzw. gemäß der Richtlinie 93/88/EWG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (ABl. Nr. L 268/71 v. 29.10.1993) zu den Risikogruppen 1 oder 2 gehören, bzw. den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (BGBl. I, S. 2067-2083 v. 21.12.1993) zugeordnet werden können.

² Dieses Formblatt kann auch verwendet werden, wenn der Unterzeichnete eine Hinterlegung eines Mikroorganismus, die er selbst oder sein Rechtsvorgänger außerhalb des Budapester Vertrags bei derselben Hinterlegungsstelle vorgenommen hat, in eine Hinterlegung nach dem Budapester Vertrag umwandelt. Dabei ist unerheblich, ob die Ersthinterlegung vor (Regel 6.4 Buchstabe d) oder nach dem Zeitpunkt stattgefunden hat, zu dem die Stelle den Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben hat.

³ Nummer, Symbole usw., die der Hinterleger dem Mikroorganismus zugeteilt hat.

⁴ Es wird dringend empfohlen, die taxonomische Bezeichnung und/oder die wissenschaftliche Beschreibung des Mikroorganismus (siehe unter VII.) anzugeben.

⁵ Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

III. AUFBEWAHRUNGSBEDINGUNGEN

()

- Nach Anbruch der Packung abfüllen in Sterilkulturen (z.B. Kulturen + 4,5 ml Glycin) und lagern bei -20°C.
- oder Aufbewahrung im flüssigen Stickstoffkühlungsmedium (z.B. Pro-Lab, DMSO, Kanamycin) bei -20°C.

IV. BEDINGUNGEN FÜR DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG

()

- Nährböden (Oxoid, BBL - u. Co.) + 100 µg/ml Ampicillin oder Nähragar (Oxoid, BBL - u. Co.)
- 37°C, 16-18 Stunden

V. BESTANDTEILE DER MISCHKULTUR (wenn zutreffend)

()

Beschreibung der Bestandteile:

Verfahren, die die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Bestandteile ermöglichen:

VI. EIGENSCHAFTEN, DIE FÜR DIE GESUNDHEIT ODER DIE UMWELT GEFÄHRLICH SIND

(X)

Risikogruppe des Mikroorganismus gemäß Merkblatt 'Sichere Biotechnologie', Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien bzw. Pilze (B 006 und B 007) der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie:

Risikogruppe 1

Der zu hinterlegende Mikroorganismus darf unter folgenden Laborsicherheitsmaßnahmen¹ gehandhabt werden:

(X) L1

() L2

Der Mikroorganismus hat folgende Eigenschaften, die für die Gesundheit oder die Umwelt gefährlich sind oder sein können:

Bitte angeben:

(X) Dem Unterzeichneten sind derartige Eigenschaften nicht bekannt.

Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Merkblatt 'Sichere Biotechnologie', Eingruppierung biologischer Agenzien, Bakterien bzw. Pilze (B 006, B 007) der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie bzw. gemäß der Richtlinie 93/88/EWG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (ABl. Nr. L 268/71 v. 29.10.1993) zu den Risikogruppen 1 oder 2 gehören, bzw. den Sicherheitsstufen S 1 oder S 2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (BGBl. I, S. 2067-2083 v. 21.12.1993) zugeordnet werden können. Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

1. ANGABEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS

Bezeichnung: E. coli BL 21 (DE3) (NOVAGEN)

Risikogruppe: (x) RG1 () RG2

Sensitivitäten: Rifampicin

Resistenzen:

Auxotrophien:

besondere Eigenschaften: lon⁻ omp T⁻
(z.B. Restriktions-/Modifikationssystem,
generelle genetische Rekombination)

2. ANGABEN ZUM SPENDERORGANISMUS

Bezeichnung: E.coli 0138:KS1 E57

Risikogruppe: () RG1 (x) RG2 () RG3

Beschreibung des klonierten DNA-Fragments:

Informationsgehalt: subgenisches Fragment der B-Untereinheit von stx2e

Größe (in bp): 228 bp

() vollständiges Genom () cDNA
() subgenomisch () synthetisch
(x) subgenisch

Gefahrenpotential der klonierten DNA:

(x) kein Gefahrenpotential

() pathogen () tumorigen
() toxisch () allergen

3. ANGABEN ZUM VEKTOR

Bezeichnung: pET-15b (Novagen)

Abkömmling (Derivat) von:

Wirtsspezifität: E.coli

Resistenzen: Ampicillin

Größe (incl. Insert): 5936 bp

Promotoren: T7 promotor

weitere vorhandene Leserahmen: lac I

Angaben zu Mobilisierbarkeit und eigenen Transfer-Systemen:

Angaben zur eigenen Infektiosität:

Möglichkeit des Transfers durch endogene Helferviren:

4. ANGABEN ZUM GVO¹besondere Eigenschaften: Produktion eines subgenischen Fragmentes der
(z.B. Produktion von ...; Einsatz als ...-Vektor etc.) B-Untereinheit von stx2e

Fremd-DNA: () chromosomal integriert (x) episomal

Gefahrenpotential: () pathogen () tumorigen
() toxisch () allergen

(x) kein Gefahrenpotential

bitte begründen: Die B-Untereinheit ist nicht toxisch

Die Hinterlegung eines gentechnisch veränderten Organismus der Sicherheitsstufe 2 kann gemäß GenTG⁴ nur in Kraft treten, wenn der DSMZ eine Kopie der Ergebnisse der Sicherheitsüberprüfung durch die zuständige Behörde vom Hinterleger zugesandt wird.¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Merkblatt 'Sichere Biotechnologie', Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien bzw. und Pilze (B 006, B 007) der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie bzw. gemäß der Richtlinie 93/88/EWG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (ABl. Nr. L 268/71 v. 29.10.1993) zu den Risikogruppen 1 oder 2 gehören, bzw. den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (BGBl. I, S.2067-2083 v. 21.12.1993) zugeordnet werden können.³ Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.⁴ Gesetz zur Regelung der Gentechnik (BGBl. I. S. 2067-2083 v. 21.12.1993)

VIII. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG⁷(x)⁸IX. WEITERE ANGABEN⁸()⁹X. VERBLEIB DER KULTUR NACH ABLAUF DER VORGESCHRIEBENEN AUFBEWAHRUNGSDAUER¹⁰

- a) Die Kultur soll in den Bestand der öffentlichen Sammlung der DSMZ überführt werden ☐ ja ☐ nein
- b) Die Kultur soll gegen Gebühr an den Hinterleger zurückgegeben werden ☒ ja ☐ nein
- c) Die Kultur soll durch die DSMZ vernichtet werden ☐ ja ☐ nein

XI. HINTERLEGER¹¹

Name:

Unterschrift:

O. Lohmann

P. H. FLORE

Anschrift:

Datum:

LOHMANN ANIMAL HEALTH
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Straße 4
27472 Cuxhaven

05.03.99
05.03.99.

⁵ Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

⁷ Es wird dringend empfohlen, die wissenschaftliche Beschreibung und/oder die vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung (unter I.) des Mikroorganismus anzugeben.

⁸ Wenn erwünscht, können hier Name und Adresse der/des Erfinder/s eingetragen werden.

⁹ Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben (außer den unter Fußnote 5 genannten) eingereicht werden, z. B. Herkunft des Mikroorganismus, Name und Anschrift anderer Hinterlegungsstellen, bei denen der Mikroorganismus hinterlegt worden ist, oder das für die Festlegung der vorgeschlagenen taxonomischen Bezeichnung angewandte Kriterium. (Diese Angaben sind fakultativ).

¹⁰ Die Dauer der Aufbewahrung beträgt gemäß Budapester Vertrag mindestens fünf Jahre vom Eingang des letzten Antrags auf Abgabe einer Probe des hinterlegten Organismus, in jedem Fall jedoch mindestens 30 Jahre nach dem Zeitpunkt der Hinterlegung (Regel 9.1). Die hier vereinbarte Regelung gilt solange, bis es verbindliche Rechtsprechungen zu dem Sachverhalt gibt.

¹¹ Dieses Hinterlegungsformblatt ist der Vertrag zwischen Hinterleger und Hinterlegungsstelle und muß daher vom Hinterleger unterzeichnet werden. Bei Firmen sollten zwei offizielle Firmenvertreter unterschreiben. Wenn natürliche Personen für eine juristische Person unterzeichnen, so ist deren Unterschrift in Maschinenschrift zu wiederholen. Wenn nicht anders vereinbart, ist der Unterzeichner Korrespondenzpartner der DSMZ.

Ergänzende Angaben zum gentechnisch veränderten Organismus

I. Angaben zur Fremd-DNA:

Subgenisches Fragment der B- Untereinheit des Shiga Toxins 2e (StxB2e)

Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) werden mit intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen bei Mensch und Tier in Verbindung gebracht. Zu diesen zählt unter anderem auch die durch das Stx2e hervorgerufene Ödemkrankheit der Schweine. STEC produzieren Shiga Toxine, die als bedeutender Faktor in der Pathogenese angesehen werden. Man unterscheidet zwei Toxintypen: Stx1 und Stx2 (mit mehreren Varianten, zu denen auch das Stx2e zählt). Alle Stx teilen charakteristische Merkmale: Sie bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einem Pentamer von B-Untereinheiten, das für die Rezeptorbindung verantwortlich ist (O'Brien, 1989). Die Wirkungsweise der Stx ist sehr gut charakterisiert: Nach der durch die B-Untereinheit vermittelten Bindung an die Wirtszelle wird das Toxin aufgenommen und durch eine Protease gespalten. Es entsteht das toxische A1-Subfragment, das durch Inaktivierung der 60S-Untereinheit des Ribosoms die Proteinbiosynthese hemmt. Der restliche Abschnitt des Toxins, d.h. der carboxyterminale Anteil der A-Untereinheit (A2-Subfragment) mit dem daran gebundenen Pentamer der B-Untereinheiten, sind nicht zytotoxisch.

Da durch Stx hervorgerufene Erkrankungen in vielen Fällen akut bis perakut verlaufen, ist eine Prophylaxe im Sinne einer Immunisierung besonders erstrebenswert. In Versuchen mit chemisch (Awad-Masalmeh, 1989) bzw. rekombinant (Gordon, 1992) verändertem Stx2e-Holotoxin konnte gezeigt werden, daß das Toxin in vivo neutralisierende Antikörper induziert, die vor Zellschäden schützen können. Ein Problem dieser Versuche war jedoch die teilweise vorhandene Resttoxizität der eingesetzten Proteine. Mehrere Arbeitsgruppen konzentrierten sich aus diesem Grund auf die isolierte Stx-B-Untereinheit als Immunogen, da sie die Rezeptorbindung des Toxins vermittelt und per se nicht toxisch ist. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer Infektion mit Stx2e-bildenden *E. coli* Antikörper gegen die B-Untereinheit gebildet werden (Franke et al., 1994). Der GVO *Escherichia coli* BL21 [pHIT-24] mit der Fähigkeit zur Expression der B-Untereinheit von Stx2e dient zur Erzeugung einer rekombinanten Vakzine gegen die Ödemkrankheit der Schweine.

Awad-Masalmeh, et al., 1989. *Dt. Tierärztl. Wochenschr.* **96**: 397-432.

Boyd et al., 1991. *Infect. Immun.* **59**: 750-757.

Franke et al., 1994. *Vet. Microbiol.* **43**: 41-52.

Gordon et al., 1992. *Infect. Immun.* **60**: 485-490.

O'Brien and Holmes, 1987. *Microbiol. Rev.* **51**: 206-220.

II. Angaben zum Vektor

Plasmid pET-15b

Risikobewertung:

Risikogruppe 1

Begründung:

Der Expressionsvektor pET-15b ist ein kommerziell vertriebener Plasmid-Vektor, der in *E. coli*-K12-Stämmen vermehrt werden kann. Seine Nukleotidsequenz und genetische Organisation sind vollständig bekannt. Der Vektor trägt allgemein übliche Selektionsmarker (Resistenz gegen Ampicillin), jedoch keine virulenz- oder pathogenitäts-determinierenden Sequenzen.

III. Angaben zum Empfänger

Escherichia coli BL21(DE3)

Risikobewertung: **Risikogruppe 1**

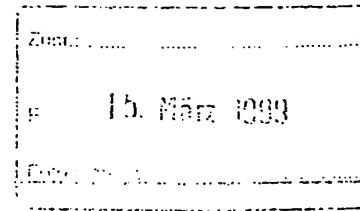
Begründung:

Der als Empfänger verwendete E.coli-Stamm ist ein Derivat von Escherichia coli-K12. E.coli K12-Derivate sind im Anhang I Teil B II GenTSV der Risikogruppe 1 zugeordnet, und mit entsprechendem Vektor als biologische Sicherheitsmaßnahme B 1 zugelassen (Anhang II A, GenTSV). Die verwendeten Stämme sind gentechnisch veränderte K12-Derivate, deren sicherheitsrelevanten Eigenschaften durch die Veränderungen nicht beeinträchtigt wurden (genetische Stabilität, fehlende Kolonisationsfähigkeit außerhalb definierter Umgebungsbedingungen, Apathogenität für Mensch, Tier und Pflanze, Ungefährlichkeit für die Umwelt, geringer Genaustausch mit anderen Organismen). Die K12-Derivate erfüllen nach wie vor die Bedingungen von biologischen Sicherheitsmaßnahmen (§ 6 Abs. 4 GenTSV).

DSMZ Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven



Ihr Zeichen / Your ref.

Unser Zeichen / Our ref.

Tel.

Datum/Date

05 31 / 26 16 -

P082 99/H

254

11.03.1999

Hinterlegung von Mikroorganismen nach dem Budapester Vertrag

Sehr geehrte Damen und Herren,

beiliegend erhalten Sie unsere Aufnahmebestätigung und Lebensfähigkeitsbescheinigung für

Escherichia coli Cux-SLT-II₉-B - DSM 12721

sowie unsere Rechnung 9901265.

Mit freundlichen Grüßen

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-
organismen und Zellkulturen GmbH

A handwritten signature in black ink, appearing to read "V. Weihs".

Dr. Vera Weihs

Weitere Mitteilung: Nach der Konservierung des Stammes erhalten Sie Proben zur Überprüfung zugesandt.

Geschäftsführer:
Prof. Dr. Erko Stackebrandt

Aussichtsratsvorsitzender:
MR Dr. Axel Kohlatschny

Bankkonten:
NORD/LB Braunschweig, Kto.-Nr. 2 039 220 (BLZ 250 500 00)
SWIFT: NOLADE 2H
Postbank Hannover, Kto.-Nr. 1060 79 - 304 (BLZ 250 100 30)

Registergericht:
Amtsgericht Braunschweig
HNB 2570

DSMZ - Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig - Germany
Telefon: 05 31 / 26 16 - 0
Telefax: 05 31 / 26 16 - 418
E-mail: dsmz@gol.de


Anlage 2

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: Cux-SLT-II _e -B	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 12721
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1999-03-09 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1999-03-11

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Cux-SLT-II _g -B	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12721
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> (X) a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1999-03-09 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1999-03-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.


Anlage 3

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG Anschrift: Heinz-Lohmann-Str. 4 27472 Cuxhaven		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 12721 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1999-03-09	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1999-03-09 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1999-03-11	

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Lohmann Animal Health
GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4

27472 Cuxhaven

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG Address: Heinz-Lohmann-Str. 4 27472 Cuxhaven	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12721 Date of the deposit or the transfer: 1999-03-09
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1999-03-09 ¹ . On that date, the said microorganism was (X) ² viable () ² no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ³	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Wechs</i> Date: 1999-03-11

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.
- ⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

File No.: PCT/EP00/05127

Applicant: Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG

Attorney's file: 43 222-22

Claims

1. A recombinant fusion protein having a B sub-unit (Stx2eB) of the 2e Shiga toxin in a fusion with an N-terminal His tag the size of which approximately corresponds to the size of the B sub-unit or a fraction of the B sub-unit.
2. The recombinant fusion protein according to claim 1 wherein the size of the terminal tag is 1 kDa, as a maximum.
3. The recombinant fusion protein according to claim 1 or 2 which has an amino terminal His tag.
4. The recombinant fusion protein according to any one of claims 1 to 3 which has a plurality of crosslinked fusion proteins.
5. A (vaccine) substance composition for vaccination and/or diagnostics in the oedematose of animals, particularly those of mammals, specifically pigs, having a B sub-unit (Stx2eB) of the 2e Shiga toxin in a fusion with an N-terminal His tag the size of which approximately corresponds to the size of the B sub-unit or a fraction of the B sub-unit.
6. The (vaccine) substance composition according to claim 5 wherein the size of the terminal tag is 1 kDa, as a maximum.

- 2 -

7. The (vaccine) substance composition according to claim 5 or 6 which has an amino terminal His tag.
8. The (vaccine) substance composition according to claims 6 to 7 which has a plurality of crosslinked fusion proteins.
9. The (vaccine) substance composition according to any one of claims 5 to 8 which comprises one additional antigen or several additional antigens.
10. The (vaccine) substance composition according to claim 9 wherein the one additional antigen or the several additional antigens are selected from the group comprising a *Pasteurella multocida* bacterin including a cell-bonded toxoid, a *Bordetella bronchiseptica* bacterin, an *Erysipelothrix rhusiopathiae* antigen, one or more soluble non-cell toxoids of type D *Pasteurella multocida* and/or *Escherichia coli* and/or *Clostridium perfringens*, disactivated whole cells of type A or D *Pasteurella multocida*, cultures of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* as well as Porcine Reproduction and Respiratory Syndrom virus, influenza virus, Pseudorabies virus, and Porcine Circoviruses I and II.
11. The (vaccine) substance composition according to any one of claims 5 to 10 which comprises the B sub-unit (Stx2e) of the 2e Shiga toxin in a fusion with an N-terminal His tag and, optionally, at least one additional antigen each in an immunogenic amount for the vaccination of pigs against the oedematose of pigs or against the oedematose of pigs and other viral and/or bacterial infections.

- 3 -

12. (Vaccine) substance compositions according to any one of claims 5 to 11 in compositions and amounts such that if pigs are vaccinated sequentially or simultaneously they immunize them against the oedematose of the pigs or against the oedematose of the pigs and other viral and/or bacterial infections.
13. A (vaccine) substance composition having a B sub-unit (Stx2eB) of the 2e Shiga toxin in a fusion with an N-terminal His tag the size of which approximately corresponds to the size of the B sub-unit or a fraction of the B sub-unit, particularly according to any one of claims 5 to 12, in a W/O/W emulsion, in a W/O emulsion or in an aqueous suspension.
14. The vaccine) substance composition according to claim 13 including an incomplete Freund adjuvant (iFA).
15. A plasmid containing DNA which encodes a fusion protein according to any one of claims 1 to 4.
16. An E.coli strain transformed by a plasmid according to claim 15.
17. An E.coli strain according to claim 16, deposited with the DSZM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen under the number DSM 12721.
18. A method for the recombinant preparation of a B sub-unit (Stx2eB) of the 2e Shiga toxin in a fusion with an N-terminal His tag wherein a sub-unit from the Stx2e operon is cloned into a suitable vector system which is encoded for the B sub-unit (Stx2eB) of the 2e Shiga toxin in a fusion with the N terminal His tag, the resultant recombinant plasmid is transformed into an E. coli strain, the

- 4 -

resultant expression system is induced, and the fusion protein is expressed and purified.

19. The method according to claim 18 wherein the size of the terminal tag is 1 kDa, as a maximum.
20. The method according to claim 18 or 19 wherein the terminal tag is an amino terminal His tag.
21. The method according to any one of claims 18 to 20 wherein the expression culture is subjected to a lytic buffer treatment.
22. The method according to any one of claims 18 to 21 wherein the expression culture is subjected to a treatment in a French Press or by ultrasonic sound.
23. The method according to any one of claims 18 to 22 wherein the expression culture, after being treated by the French Press or ultrasonic sound and/or a lytic buffer, is submitted to an affinity chromatographic purification.
24. The method according to claim 23 wherein purification is performed by means of a FPLC.
25. The method according to any one of claims 18 to 24 wherein the purified fusion protein undergoes crosslinking.
26. A method wherein the fusion of spleen cells of mice immunized by using the recombinant fusion protein according to any one of claims 1 to 4 with myelom

OFF OF ANDY

- 5 -

cells is used for producing hybridoma clones for the preparation of anti-Stx2eB immune globulins.

27. The method according to claim 26 where the antibodies produced by means of the hybridoma clones are employed for the in-process control for the production of the recombinant fusion proteins.
28. The method according to claim 26 or 27 wherein the antibodies produced by the hybridoma clones are used for an affinity chromatographic purification method for the Stx2e holotoxin.